

UNTERSUCHUNGEN AN SPELZEN VON AVENA SATIVA,
AVENA FATUA UND FRÜCHTEN VON ROSA
ZUR ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG
NEUER KEIMUNGSINHIBITOREN

Disbui. München

1988

Siegfried Franz Muche



UNTERSUCHUNGEN AN SPELZEN VON AVENA SATIVA,
AVENA FATUA UND FRÜCHTEN VON ROSA
ZUR ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG
NEUER KEIMUNGSHINHIBITOREN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät
für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Siegfried Franz Muche
München

1988

1. Berichterstatter: Prof Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Aufgaben und Problemstellung	8
III. Experimenteller Teil (Material und Methoden)	9
A. Präparativer Teil	
1. Pflanzenmaterial	9
2. Gewinnung von peroxidfreiem Diethylether	9
3. Gewinnung des wässrigen Rohextrakts	10
4. Extraktion bei verschiedenen pH-Werten	12
4.1. Extraktion bei pH-7	12
4.2. Extraktion bei pH-1	13
4.3. NH_3 -Verseifung	13
5. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20	13
6. Gefriertrocknung	14
7. Destillationsmethoden	15
7.1. Horizontaldestillation	15
7.2. Kurzwegdestillation im Stickstoffstrom	17
8. Hochdruckflüssigchromatographie	18
9. Säulenchromatographie an LichroPrep-Si-60	19
B. Analytischer Teil	
1. Biotest	20
2. Gaschromatographie	20
2.1. Gaschromatographie mit gepackter Säule	20
2.2. Gaschromatographie mit Glaskapillare	21
3. Derivatisierung mit Diazomethan	22
4. Apparative Bedingungen für GC/MS	22
4.1. Untersuchung von Flughafer	22
4.2. Untersuchung von Saathafer	23
5. Chemikalien/Reagenzien	23
6. Maßgefertigte Glasgeräte	23

IV. Ergebnisteil

A. Saathafer

1. Wässriger Rohextrakt
2. Aufteilung des Rohextrakts mittels Etherextraktion in Fraktionen bei verschiedenen pH-Werten
 - 2.1. Etherextraktion bei pH-7
 - 2.2. Etherextraktion bei pH-1
3. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20
4. Gefriertrocknung der hemmaktiven Fraktionen
5. Derivatisierung der Hemmfraction
6. Horizontaldestillation
6. Kurzwegdestillation im Stickstoffstrom
8. Hochdruckflüssigchromatographie
9. Gaschromatographie
10. Gaschromatographie/Massenspektrometrie
11. Strukturbestimmung der Hemmfractionen
12. Anwendungen des Amaranthuskeimtests
 - 12.1. Biotest
 - 12.2. Berechnung der Konzentration für den Biotest
 - 12.3. Gehaltsbestimmung der Hemmstoffe in Hafer, Korrelation im Biotest
 - 12.4. Biotests mit verschiedenen "Cocktails"
 - 12.5. Abblaseversuche

B. Flughafer

1. Wässriger Rohextrakt/pH-1-Fraktion
2. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20
3. Gefriertrocknung
4. Horizontaldestillation/Kurzwegdestillation
 - 4.1. Ablauf der Horizontaldestillation
 - 4.2. Vorversuche
5. Gaschromatographie

6. Massenspektrometrische Untersuchung	64
7. Biotest mit den identifizierten Komponenten	69
8. Flüchtige Bestandteile in Pflanzenextrakten und ihre Bedeutung als Inhibitoren	71
9. Direkte qualitative und quantitative Bestimmung von flüchtigen Bestandteilen in Weinessig	72
C. Hagebutten (Rosa)	
1. Rohextrakt	73
2. Extraktion bei verschiedenen pH-Werten	73
2.1. Extraktion bei pH-7	73
2.2. NH_3 -Verseifung	74
2.3. Extraktion bei pH-1	75
3. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20	75
4. Untersuchung der Fraktion I	76
4.1. Derivatisierung	76
4.2. Horizontaldestillation	77
5. Gaschromatographie	78
6. Untersuchung der Fraktion II	79
6.1 Säulenchromatographie an Si-60	79
6.2 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure	80
6.3 Vergleich der Bioaktivität von Fr.II mit authentischer Abscisinsäure	82
V. Diskussion	83
VI. Zusammenfassung	90
VII. Literaturverzeichnis	93



Digitized by the Internet Archive
in 2026

WÜRDIGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, Menzinger Str. 67, München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, für seine Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge, mit welchen er am Fortgang meiner Versuche teilhatte.

Bei Frau Inge Blos und Frä. Claudia Zenger bedanke ich mich für die Hilfe bei der Gaschromatographie, sowie für die Unterstützung bei allgemeinen Laborarbeiten.

Herrn Josef Harzer danke ich für die Hilfe bei den Aufarbeitungen.

Für die Anfertigung der Massenspektren und Hilfe bei deren Auswertung danke ich Herrn Prof. Dr. W. Schäfer Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Für den lebhaften Gedankenaustausch danke ich Frau Dr. E. Lohaus und Frau Ulrike Oster

I. EINLEITUNG

Die Beschreibung und die Entdeckung der sogenannten "sekundären Pflanzeninhaltsstoffe" und deren Bedeutung ist sehr weit in der Biologie verbreitet und auch sicherlich noch lange nicht abgeschlossen. Biologische Wirkstoffe dienen der Pflanze zur Durchsetzung der eigenen Art und der Abwehr von Feinden, die als konkurrierende Pflanzen, feindliche Insekten oder als klimatische Veränderungen auftreten. Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts gab es in diesem Zusammenhang umfassende Untersuchungen und Klassifizierungen über Wirkstoffklassen (Verschaffelt, 1910). Vor etwa 50 Jahren wurde der Begriff Allelopathie geprägt, der den Einfluß einer Pflanze auf die andere beschreibt (Molisch, 1937).

Günther gab einen Überblick über die verschiedenen Abwehrsysteme der Pflanzen (Günther, 1984). So schützt sich die Tabakpflanze durch Nicotin vor Blattläusen. Das uns als Genußgift vertraute Alkaloid wirkt hier als starkes Zellgift. Mit schwer verdaulichen Proteinen verderben Tomate und Kartoffel diversen Insekten den Appetit. Oxalsäure wirkt in Rhabarber und Spinat; Oxalatkristalle stellen scharfkantige Schneidwerkzeuge dar. Wer kennt nicht die Brennnessel; hier besteht der Abwehrmechanismus aus einem Zusammenwirken von chemischer (Ameisensäure/Eiweißstoffe) und mechanischer Abwehr (Silikatkristalle), (Haberlandt, 1886).

Unreife Früchte sichern sich die Reifung durch Produktion verschiedener Phenole, Tannine und anderer Bitterstoffe. Diverse Alkaloide wirken als Appetitzügler. Meerrettich bekämpft Fraßfeinde mit OCS-Gas (Kohlenoxidsulfid). Allgemein wird beobachtet, daß die Wildformen unserer Nutzpflanzen ausgeprägtere Abwehrsysteme besitzen, als die Kulturformen (Günther, 1984).

Die Aufklärung und Identifizierung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe hat für die moderne chemische Industrie nicht zu unterschätzende Bedeutung. Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen steht häufig ein Naturstoff Pate. Die Analogie bestimmter chemischer Merkmale macht es möglich, innerhalb kurzer Zeit aus einem einzigen Naturstoff eine

ganze Palette nuancierter Wirkstoffe synthetisch aufzubauen. Die Schrader-Regel (Schrader, 1950) ist mittlerweile gut 40 Jahre alt; sie beschreibt die Strukturmerkmale der insektiziden Phosphorsäureester. In der Pionierzeit der chemischen Wirkstoffforschung gegen Ende des vorigen Jahrhunderts wurde über das Zufallsprinzip mancher biologische Wirkstoff entdeckt und alsbald im pharmazeutischen, medizinischen oder biotechnischen Bereich etabliert. Bei der Entwicklung können prinzipiell zwei Wege beschritten werden (Büchel, 1979):

Eine willkürlich ausgewählte Substanz wird in verschiedenen biologischen Tests auf Wirksamkeit untersucht. Sobald irgendeine Wirkung konkret und wissenschaftlich haltbar erkannt ist, ist ein neuer Wirkstoff geboren. DDT mag als Beispiel für diesen Weg dienen. Von diesem Stoff ließ sich in der Folgezeit eine Vielzahl insektizider Substanzen ableiten, (Holan, 1969).

Der andere Weg geht von der Wirkung bestimmter Pflanzen, Pflanzenteilen oder -inhaltsstoffen aus. Eine wirksame Substanz kann isoliert werden und steht, synthetisch hergestellt, in beliebiger Menge zur Verfügung. Im weiteren Verlauf der wirkstofforientierten Forschung dienen die Naturstoffe als Modellsubstanzen, die Wirksamkeit oder die Schädlichkeit wird den geänderten Anforderungen angepasst. Über die Analogie bestimmter biochemischer und biophysikalischer Aufgaben kann dann eine Vielzahl neuer Möglichkeiten als logische Konsequenz vorgestellt werden. So gibt es mittlerweile fein abgestufte Antibiotika vom Penicillintyp, die auch resistente Krankheitserreger angreifen oder allergisch reagierenden Patienten helfen.

Die Ursache von Wachstum und Keimung der Pflanzen zu beobachten und zu ergründen kann als eine grundlegende Fragestellung der botanischen Forschung angesehen werden. Nicht zuletzt ist es auch der Gedanke des Nutzbarmachens von Pflanzen und Pflanzenteilen, die zu solchen Überlegungen Anlaß geben.

Bereits Albertus Magnus (1193–1280) beobachtete, daß die Samen fleischiger Früchte (Kürbis, Tomate) besser auskeimen, wenn man das Fruchtfleisch vorher entfernt (Römpf, 1974). Mit der Verschiedenartigkeit keimungsstimulierend wirksamer Faktoren beschäftigt sich eine große Zahl wissenschaftlicher Arbeiten. Als Beispiel für die

Weitläufigkeit der wissenschaftlichen Bemühungen mag der Hinweis auf eine Langzeitstudie über den Zusammenhang von Sonnenflecken-tätigkeit und Samenkeimung dienen (Fischer, 1982). Wo der Wirkungsansatz wachstumsregulatorisch wirksamer Substanzen zu suchen ist, ist im Einzelnen nur lückenhaft geklärt. Es gehören dazu Veränderung des osmotischen Gefüges, pH- Wert-Änderung, Beeinträchtigung der Atmung über Oxidasehemmung; schließlich Reaktionen mit der Zellmembran (Ketring, 1973).

Der Einfluß quasi aller Pflanzenteile auf Keimung und Wachstum gilt als gesichert. So können sowohl Frucht, Samen als auch Samenschale Hemmstoffe, auch Inhibitoren genannt, enthalten. Man findet sie auch in Wurzel, Stamm, Blättern und Blütenblättern (Evenari, 1949). Vielfach ist die Wachstumsregulierung auch mit einer Abwehrfunktion gegen andere Pflanzen, Mikroorganismen und Insekten verbunden (Schildknecht, 1981).

Inhibitoren sind zum großen Teil nicht artspezifisch. Ein und derselbe Hemmstoff kann die Keimung auch anderer Arten beeinflussen. Einige weisen nach exogener Applikation z.B. in Form der wässrigen Extrakte eine wachstumshemmende oder retardierende Wirkung auf verschiedene Pflanzen oder Pilze auf. Dabei variiert die Empfindlichkeit sehr. Hemmstoffe lassen sich nicht einheitlich klassifizieren. Summarisch kann man sie jedoch in einige Gruppen einteilen:

Hemmstoffklassen:

- aliphatische Verbindungen:
Fettsäuren, Fettsäureester, Cucurbinsäure
- phenolische Verbindungen:
Carbonsäuren, Lignane, Batatasine
- Zimtsäurederivate:
Cumarine, Furocumarine, Ferulasäure, Aesculin
- Terpene:
Sesquiterpene, Diterpene, terpenoide Lactone
- Pyridinderivate
- Depside
- Chinone
- Flavonoide



Daneben sind noch einige Hemmstoffklassen genannt worden, die chemisch weder untereinander noch mit den erwähnten Gruppen verwandt sind. Hierzu gehört beispielsweise Maleinsäurehydrazid (stengel- und blattwuchsverkürzende Wirkung), quartäre Ammoniumverbindungen, Hydrazinderivate, Fluorencarbonsäurederivate, Abscisinsäure (Berrie, 1975).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Samenkeimung und Wachstum zu beeinflussen und die Keimfähigkeit trotzdem zu konservieren, bieten sich für keimhemmende Stoffe rein gedanklich vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten bei der Aufzucht von Kulturpflanzen oder Erhöhung von Ernteaussbeuten auf möglichst naturidentische Weise. Denn durch die beschriebenen Eigenschaften natürlich isolierter Pflanzeninhaltsstoffe kann die Keimfähigkeit der Samen über einen langen Zeitraum erhalten bleiben, das Überleben verschiedener Arten bedingt werden oder auch die Durchsetzungsrate gegenüber anderen Spezies erhöht werden.

In Anbetracht der zunehmenden Abneigung gegenüber völlig synthetischen Wuchs- und Hemmstoffen dürfte dieser Wirkstoffklasse in Zukunft wachsende Beachtung geschenkt werden. In der Landwirtschaft finden Hemmstoffe bislang Verwendung als Halmfestiger, Keimungshemmer oder Wachstumsregulatoren - weniger jedoch als Herbizide (Römpp, 1974).

Zur Untersuchung verschiedener Pflanzenextrakte auf keimungshemmende Inhaltsstoffe war Hafer in seiner Wildform (Flughafer, *Avena fatua*) und in der Kulturform (Saathafer, *Avena sativa*) schon mehrfach herangezogen worden. Berrie (1975/1979) untersuchte die Wirkung niederer Fettsäuren, endogen in beiden Sorten gefunden, auf ihre keimhemmende Wirkung. Die inhibitorische Wirkung von Fettsäuren mit 5 - 11 Kohlenstoffatomen betrug bis zu 50% (Nonansäure); für diesen Effekt war eine Konzentration von 1×10^{-3} mol/l Testlösung notwendig. Bei Versuchen mit Salatsamen reichte für diesen Effekt die Hälfte der Konzentration. Der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren lag beim Flughafer etwa 10mal höher als bei Saathafer. Berrie brachte die Beendigung der Keimruhe und die Zeitspanne der Nach-

reife in Zusammenhang mit dem Abbau der flüchtigen Fettsäuren während der trockenen Lagerung. Besonders bei Flughafer ließ sich diese Beziehung herstellen. Buller und Parker (1976) berichteten über die Hemmwirkung verschiedener kurzkettiger Fettsäuren auf die Keimrate von Gerste. Nonansäure wurde dabei aus dormanten Samen isoliert. Eine neuere Arbeit über Keimung und Wachstum bei Hafer berichtet über die wachstumsbeeinflussende Wirkung von Triterpenoidglycosiden, die in der Pflanze gefunden wurden (Hägqquist, 1984).

Aus anderen Getreidesorten waren in allerjüngster Zeit Fettsäuren identifiziert worden, denen ein inhibitorischer Effekt zugeschrieben werden kann (Tzuzuki, 1987). Die inhibitorische Wirkung wurde hier mittels Keimtests an Reissaat nachgewiesen. Ein anderer "Säure"-Hemmstoff wurde in Form von Hexylitaconsäure aus *Aspergillus niger* isoliert (Isogai, 1984).

Die Beschreibung der Wirkungsweise saurer Pflanzeninhaltsstoffe, insbesondere Wirkungsunterschiede einzelner Strukturelemente innerhalb homologer Reihen halten an. Die bereits von Schildknecht (1971) isolierte 3-Hydroxydecansäure (Myrmicacin) wurde erst kürzlich mit strukturähnlichen Komponenten hinsichtlich der Kohlenstoffkettenlänge und Position der Hydroxylgruppe verglichen (Orito, 1986).

Frisch geernteter Hafer befindet sich in Keimruhe und erlangt erst nach Abschluß einer längeren Nachreifungsperiode seine volle Keimfähigkeit. Die Stärke der Keimruhe hängt von verschiedenen äußeren Bedingungen während der Reifung, unter anderem von Licht, Wasserversorgung und Temperatur ab (Owen, 1956; Stalkow, 1959). Diese Parameter beeinflussen die Saatkeimung auch anderer Spezies (Olandrian, 1985; Conover, 1984). Während der Nachreife sind Proteaseaktivität gesteigert, Acidität und Wasserbindungsvermögen nehmen zu (Atwood, 1914). Gleichzeitig nimmt der Gehalt an löslichen Keimungshemmstoffen ab. Karl (1978) und Lohaus (1981) zeigten in ihren Arbeiten, daß durch Wasserextraktionen von Haferspелzen Hemmstoffe angereichert werden konnten, die sich mit verschiedenen Trennmethode in Fraktionen aufteilen ließen. Diese Hemmfraktionen verhinderten bzw. hemmten das Wachstum der eigenen Spezies und auch das anderer, monokotylar wie dikotylar Pflanzen. Das Spektrum

der identifizierten Inhibitoren konnte jedoch noch keine vollständige Klärung der gesamten Bioaktivität erbringen. Die vergleichenden Biotests zeigten, daß noch immer eine restliche Hemmaktivität im Rohextrakt verblieb oder auf dem Aufarbeitungsweg verloren ging. Karl äußerte die Vermutung, daß auch flüchtige Verbindungen an der Gesamtaktivität beteiligt seien. Für diese Stoffe war das Verschwinden im Laufe der Aufarbeitungs- und Anreicherungs-schritte am leichtesten zu erklären. Karl bezifferte den Verlust an Hemmaktivität auf 15%, gemessen an der Aktivität des wässrigen Rohextraktes.

Die Fähigkeit mehrere Jahre im Boden zu verweilen, um erst in Jahren mit überdurchschnittlichen Niederschlägen vermehrt auszukeimen, kennzeichnet Flughafer als schwer zu bekämpfendes Ackerunkraut. Hierbei sind nicht nur die äußeren Bedingungen Ursache, sondern auch der Gehalt an inhibitorisch wirksamen Bestandteilen trägt zu dieser Eigenschaft bei (Owen, 1956). Es wurden verschiedene Substanzklassen identifiziert, deren zeitlicher und feuchtigkeitsbedingter Abbau zur vollen Keimfähigkeit der Flughaferkaryopsen führt (Lohaus, 1981; Bernie, 1979). Die Übertragbarkeit der Hemmaktivität auch auf andere Spezies wurden mit wässrigen Flughaferspelzenextrakten nachgewiesen (Chen, 1982). Der Gehalt an Vanillin sollte hier eine Rolle spielen. Verschiedene andere Inhaltstoffe wurden häufig in Zusammenhang mit der Keimruhe von *Avena fatua* gebracht. Beispielsweise untersuchte Chen (1979) das Verhalten von Maltose im Verlauf der Saatkeimung. Früher (Chen, 1973) waren Zeitstudien über die Amylaseaktivität beim keimenden Samen angefertigt worden.

Die Achaenen von Rosen haben ähnliche Eigenschaften wie die Karyopsen von *Avena fatua*, sie verweilen vor ihrem Auskeimen in tiefer Keimruhe. Diese Ruhepause des Saatguts zu durchbrechen, ist dem Rosenzüchter noch immer ein wohlgehütetes Geheimnis. Veränderungen im Hormongefüge beenden auf natürliche Weise diesen Tiefschlaf (Black, 1980). Gleichzeitig bauen sich Hemmstoffe ab, die gleichermaßen in Testa und Perikarp lokalisiert sind (Jackson, 1963). Das Gleichgewicht von Abscisinsäure und Gibbellerinen oder Cytokinen

verändert sich. Möglicherweise befinden sich noch andere niedermolekulare Hemmstoffe in Hagebutten, die sich mit ähnlichen Aufarbeitungsmethoden wie bei Saathafer und Flughafer erprobt, näher charakterisieren lassen. Der Gehalt an gebundener Abscisinsäure war erst bestimmt worden (Tillberg, 1983), hier gelang es, nach alkalischer Hydrolyse Abscisinsäure über Gaschromatographie/ Massenspektrometrie zu identifizieren und über Hochdruckflüssigchromatographie quantitativ zu bestimmen. Dieser Stoff, mittlerweile bestuntersuchter Hemmstoff zu bezeichnen, dient auch in neuesten Forschungsarbeiten zur Erprobung neuerer chem.- analytischer Methoden. Kürzlich wurde ein Immunoessay für ABA vorgestellt (Sotta et al., 1985)

II. AUFGABEN UND PROBLEMSTELLUNG

Die hier vorgelegte Arbeit ist als Fortführung der von Karl (1979) und Lohaus (1981) durchgeführten Untersuchungen zu verstehen. Beide Autoren zeigten in ihren Arbeiten, daß die keimungshemmende Wirkung eines wässrigen Flug-, bzw. Saathaferspelzenextraktes nicht allein auf die von ihnen beschriebenen Substanzen zurückzuführen ist. Karl gab einen allgemeinen Überblick über die hemmaktiven Fraktionen, die er nach Etherextraktion bei verschiedenen pH- Werten erhielt. Durch Ausarbeitung eines geeigneten Biotests konnte jeder Aufarbeitungsschritt in Bezug zur Anreicherung biologisch aktiver Substanzen untersucht werden.

Lohaus (1981) identifizierte aus der NH_3 -verseiften Fraktion 1,3,5-Pentantricarbonsäure (Dihydrohämatinsäure) als hemmaktiven Bestandteil von *Avena sativa*. Beide Autoren beobachteten jedoch den Verlust an biologischer Aktivität im Verlauf der Aufarbeitung. Von beiden Autoren war eine große Hemmwirkung der sauren "pH-1"-Fraktion aus Flug- und Saathaferspelzen beschrieben worden, ohne im Einzelnen über weitere Isolationsschritte bishin zu einer chemischen Struktur mit biologischer Wirksamkeit zu gelangen.

Hier erschien eine Untersuchung gerade dieser Fraktion erfolgversprechend. Dabei sollte versucht werden, eine Erklärung für die Abnahme der Hemmwirkung im Verlauf der Aufarbeitung zu finden.

An Hagebutten (*Rosa*) sollten über ähnliche Aufarbeitungsschritte (Extraktion bei verschiedenen pH-Werten), ebenfalls unterschiedliche Hemmfraktionen voneinander getrennt werden und möglicherweise neue Inhibitoren identifiziert werden.

III. EXPERIMENTELLER TEIL (MATERIAL UND METHODEN)

A. Präparativer Teil

1. Pflanzenmaterial

1.1. Flughafer, Avena fatua

Flughafer wurde zur Zeit der frühen Reife (Juli/Aug.) aus der näheren Umgebung von München (Untermenzing/Langwied) geerntet. Bis zur Verwendung wurde das Material in Plastiksäcken bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt. Zur Extraktion wurden Spelze und Karyopsen verwendet.

1.2. Saathafer, Avena sativa

Es wurden vorgereinigte, windgesichtete Haferspelze von der Meyermühle in Landshut bezogen. Der Gehalt an Karyopsen betrug weniger als 1% (Gewicht).

1.3. Hagebutten, Rosa

Verschiedene Sorten aus der näheren Umgebung Münchens (Bot. Garten, Obermenzing) wurden zum Zeitpunkt der Vollreife gesammelt und aufbereitet. Bis zur Verwendung wurden die Früchte in Portionen zu 500g bei Temperaturen bei -20°C aufbewahrt.

1.4. Pflanzenmaterial für den Biotest

Für die Biotests wurde Fuchsschwanzsamen (*Amaranthus caudatus*) der Fa. Bayerische Saatbauvereinigung, Ismaning, verwendet.

2. Gewinnung von peroxidfreiem Diethylether

Zur Extraktion bei verschiedenen pH-Werten wird peroxidfreier und frisch destillierter Diethylether nach der Methode Larson (1955), verwendet. Zu diesem Zweck wird je 1l techn. Ether mit

2,5g Eisen-II-Sulfat und 0,5g fein zerstoßenem CaO und ca. 25ml bidest. Wasser drei Minuten lang kräftig geschüttelt, dann die graugrüne (bei starker Verunreinigung braune) wässrige Phase verworfen. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Anschließend wird der Diethylether über eine Kolonne destilliert, wobei 50ml Vorlauf und ca. 100ml Nachlauf verworfen werden. Zur Herstellung absoluten Diethylethers wird die Hauptmenge des Wassers im Tiefkühlfach bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefroren, danach frisch gepreßter Natriumdraht als Trockenmittel zugesetzt. Der Ethervorrat wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3. Gewinnung des wässrigen Rohextrakts

Für alles verwendete biologische Ausgangsmaterial wird das gleiche Verfahren zur Gewinnung des wässrigen Rohextrakts herangezogen. Nur die Vorbereitung des Materials weist kleinere Varianten auf. So werden Hagebutten im tiefgefrorenen Zustand mit Hilfe eines warring-blenders grob zerkleinert. Im unversehrten Zustand sind die Extraktionen wegen der harten Fruchtschale unergiebig, zu starkes Zerkleinern führt zu einer teigigen Masse, die nicht mehr gleichmäßig vom Extraktionswasser umspült wird.

Bei der Gewinnung des Rohextraktes aus Hafer- bzw. Flughaferspelze ist das Ausgangsmaterial auch bei dichter Packung des Extraktionsgefäßes ausreichend durchlässig, so daß eine gleichmäßige Benetzung gewährleistet bleibt. Statt der gängigen Extraktionshülsen wird eine Glasfritte verwendet, die am Boden des Glaskörpers aufliegt und wirksam vor dem Übertritt des Materials in den Siede-/Anreicherungskolben schützt.

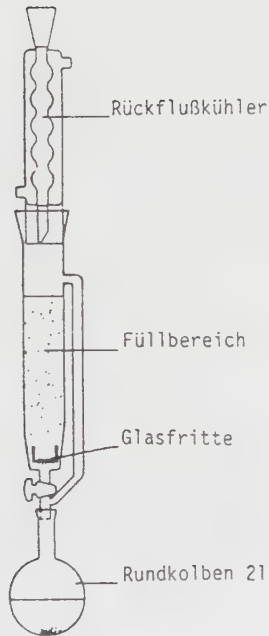


Abb.1 : Modifizierte Soxhlet-Apparatur zur Gewinnung des wässrigen Rohextrakts.

Zur Gewinnung des wässrigen Rohextrakts werden jeweils 300g Spelze trocken in die modifizierte Soxhlet-Apparatur gefüllt. Ein 3-Liter-Rundkolben mit 1.500ml Wasser als Vorlage wird angesetzt, 500ml Wasser werden von oben bis zum Überlaufrohr des Glaszylinders eingefüllt. Die Vorlage wird mit einem Heizpilz (Stufe 3) über 24 h am Sieden gehalten. Nach der Extraktion wird die Vorlage abgekühlt und das Volumen des Rohextrakts bestimmt. Bei dieser Hitzextraktion verändern sich die Hemmstoffe nicht. Karl (1979) hatte dazu Biotests nach Extraktionen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

4. Extraktion bei verschiedenen pH-Werten

4.1. Extraktion bei pH-7

Die unter Punkt 3 gewonnenen Rohextrakte (ca. 1.700ml Lösung pro Ansatz) werden gesammelt. Je Perforatoransatz werden 2.500 ml bzw. 8.500ml Lösung mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung auf pH-7,0 eingestellt (pH-Meter). Der 3- bzw. 10-Liter-Perforator (Abb.2) wird bis zur Markierung mit der wässrigen Lösung gefüllt. Nach Einsetzen der Fritte wird der Perforator mit frischem Ether aufgefüllt und eine Vorlage mit etwa 500ml Lösung zum Destillieren angesetzt. Um eine Diffusion des Ethers durch die Glasschliffe zu verhindern – die fortwährende Destillation dauert 48 Stunden –, werden diese mit Wasser benetzt. Nun wird bei milder Wärmezufuhr (Heizpilz Stufe 1) extrahiert. Nach zwei Tagen ist der Ether im Überstand des Perfortors farblos, die Vorlage wird entfernt, der Ether kann abdestilliert werden, die verbleibende wässrige Lösung wird weiterverarbeitet.

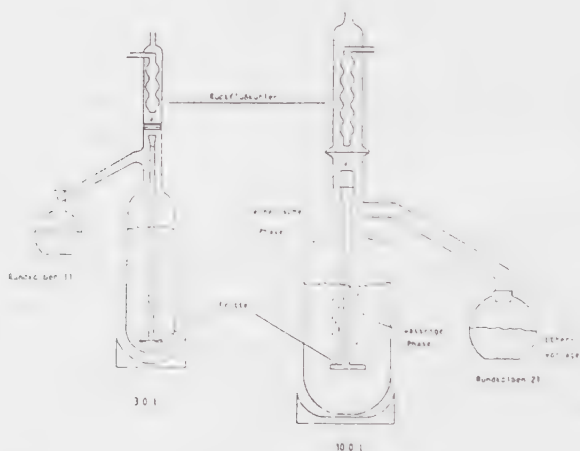


Abb.2 : 3- bzw. 10-Liter-Perforator zum Ausethern der wässrigen Naturstoffextrakte.

4.2. Extraktion bei pH-1

Unter Eiskühlung und ständigem Rühren (Magnetrührer) versetzt man die wässrige Lösung tropfenweise mit 97%iger H_2SO_4 , bis ein pH von 1,0 erreicht ist. Nun wird der Perforator wie unter Punkt 4.1. angesetzt.

Sicherheitsratschlag: Es ist auf fortdauernde Kühlung sowie auf Haut- und Augenschutz zu achten. Ebenso ist eine gute Belüftung erforderlich, da Reste des gelösten Ethers entweichen (vgl. 4.1. ca. 10% des Ethers lösen sich im wässrigen Rohextrakt).

Die so gewonnenen Stoffe werden als pH-1 Fraktion bezeichnet. Die verbleibende wässrige Lösung sowie der pH-7 Extrakt werden nicht weiterverarbeitet.

4.3. NH_3 -Verseifung

Um bei der Untersuchung von Hagebutten zu prüfen, ob es sich bei den hemmaktiven Substanzen der pH-7 Fraktion um chemisch gebundene Stoffe handelt, wird ein Teil der pH-7 Fraktion alkalisch verseift. Dazu versetzt man die Neutralfraktion mit 33%iger Ammoniaklösung bis pH- 11,0 und läßt sie über 12 Stunden unter Umrühren bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird die Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung auf pH-1,0 eingestellt und mit Diethylether extrahiert (Perforator).

5. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20

Apparative Bedingungen für die Sephadex-LH-20 Chromatographie

Säule:	Glassäule 600 x 50mm
Detektion:	Durchflußspektrometer UV-240nm Spektrochrom M, Fa. Gilson
Elutionsmittel:	Bidest. Wasser
Säulenfüllung:	Man versetzt das trockene Gel mit der 4fachen Menge Wasser, läßt 24 Stunden vorquellen, entgast am Wasserstrahlvakuum, füllt die

Säule zu 2/3 und äquilibriert mit dem Laufmittel noch etwa 3 Stunden.

Vor dem Auftragen wird das aufzutrennende Material in 2-3 ml Methanol gelöst. Vor Anschluß des Fraktionssammlers (Fa. Gilson), läßt man 250ml Vorlauf ausfließen (Totvolumen).

Zur vollständigen Elution der aufgetragenen Proben dient Methanol p.a. Zur Regeneration wird das Gel mit Methanol mehrfach gewaschen und erneut mit bidest. Wasser äquilibriert.

Die pH-1-Fraktion wird in 2-3 ml Methanol gelöst und mittels einer Pasteurpipette auf die Säule aufgetragen. Man verschließt die Säule mit einem durchbohrten Gummistopfen, durch welchen das Elutionswasser über einen Schlauch mit der Säule verbunden ist. Man richtet einen Überstand von 20ml Wasser über dem Gel ein. Durch ein selbständig gebildetes Sog-Druckgefälle beginnt die Säule zu fließen, eine Durchflußrate von 5 ml/min stellt sich ein. Zur Detektion wird ein Durchflußspektrometer (UV, 240/280nm) angeschlossen. Nachdem man etwa 250ml Verlauf verworfen hat (Totvolumen), fängt man das Eluat in Portionen zu ca. 8ml mit einem Fraktionssammler auf. Nach Beendigung der Chromatographie, sie dauert etwa 18 Stunden, wird von jedem 5. Glas ein Aliquot für den Amaranthuskeimtest abgenommen. Sobald der Biotest ausgewertet ist, vereinigt man die hemmaktiven Fraktionen und gefriertrocknet sie.

6. Gefriertrocknung

Um große Volumina bei weiteren Aufarbeitungsschritten zu vermeiden, werden die pH-1-Fraktionen nach der Chromatographie an Sephadex-LH-20 gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage L2, Fa. WKF, Brandau/Odenwald). Bei der Verarbeitung von Saathaferspelze wurden die vereinigten Fraktionen zunächst im Methanolbad auf -35 °C gekühlt und anschließend im Vakuum getrocknet. Bei der Verarbeitung von Flughaferspelze wird das Eluat nach der Sephadexchromatographie vorher mit Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. So können saure, in undissotierter Form

leichter flüchtige Verbindungen nicht im Vakuum entweichen. Nach Trocknung wird mit wenig halbkonzentrierter Schwefelsäure angesäuert und mit Diethylether ausgeschüttelt.

7. Destillationsmethoden

7.1. Horizontaldestillation

Zur schonenden Destillation geringer Substanzmengen findet der automatische Horizontaldestillator der Fa. Fischer, Bad Godesberg Verwendung (Abb.3).

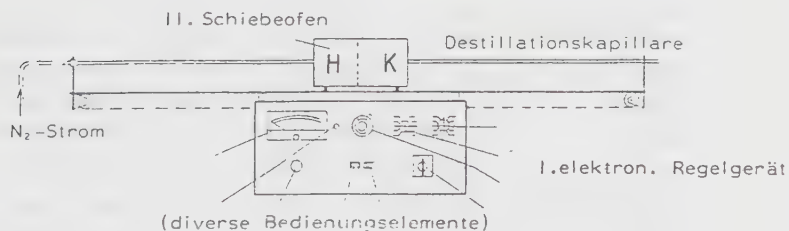


Abb.3 : Automatischer Gradientenofen der Fa. Fischer

7.1.1. Konstruktion

Das Gerät besteht aus einem elektronischen Regelgerät (Abb. 3, I) und dem horizontal von links nach rechts laufenden automatisch steuerbaren Gradientenofen (Abb.3,II), der in

einen Heizbereich (H) und einen Kühlbereich (K) unterteilt ist. Der Stufenvorschub und die Intervallzeit sind in jeweils 10 Variationen programmierbar. Im Inneren des Gradientenofens befindet sich ein Aluminiumblock, der einseitig über eine elektrische Heizung verfügt und anderseitig über eine Wasserkühlschlange gekühlt wird. Jedes beliebige Wärmegefälle ist somit kontinuierlich einstellbar. Als Destillierkapillare dienen Laborglasrohre mit 5 mm Durchmesser. Durch das Trennrohr wird ein Stickstoffstrom von 100ml/min in Richtung der Bewegung des Schiebeofens angelegt. Damit wird die Destillationsrichtung vorherbestimmt

7.1.2. Trennprinzip

Das Verfahren stellt eine Destillation dar, die es ermöglicht, auch kleine Mengen eines Substanzgemisches mit Hilfe eines Temperaturgradienten in mehrere Fraktionen weiter aufzutrennen.

Der Heizofen (Abb.3;11) wird über eine Glaskapillare bewegt. Die Anfangstemperatur ist so gewählt, daß zunächst alle verdampfbaren Substanzen aus dem Ofenbereich herauswandern. Durch den Gasstrom ist die Destillation nur in eine Richtung möglich. Während der Schiebeofen die Kapillare entlangfährt, regelt man die Temperatur des Ofens stufenweise nach unten. Über die Wasserkühlung erzeugt man im Ofen einen Temperaturunterschied von etwa 30°C. So werden leicht flüchtige Stoffe immer weiter in der Glaskapillare transportiert, schwerer flüchtige Stoffe bleiben zurück. Die dabei entstehende Fraktionierung ist im Glasrohr sofort sichtbar.

7.1.3. Arbeitsweise

Mittels einer Pasteurpipette zieht man die dünnflüssige Substanz etwa 1cm auf, schneidet den gefüllten Kapillar-

abschnitt mit einem Glasschneider an, bricht den Rest der Pipette ab und schiebt das gefüllte Ende vorsichtig in die Destillationskapillare. Die Kapillare wird nun an den Stickstoffstrom angeschlossen und zunächst bei Raumtemperatur belassen, um eventuelle Lösungsmittelreste zu entfernen. Nun heizt man den Gradientenofen auf die höchstgewünschte Temperatur (150 °C) auf. Die Intervallzeit und das Stufengefälle ist für jedes Trennproblem individuell zu ermitteln und wird im Ergebnisteil beschrieben.

7.2. Kurzwegdestillation im Stickstoffstrom

Ebenfalls zur schonenden Destillation kleiner Substanzmengen wurde ein Destillationsgerät nach eigenen Vorstellungen konstruiert. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Säbelhalskolben mit 5ml Inhalt, (vgl. Abb.4). Er erhält eine Glaskapillare zum Stickstoffeinleiten und wird mit einem S-Rohr und einer Kühlfalle versehen. Das zu destillierende Material wird bis zur halben Füllhöhe des Kolbens mittels einer Pasteurpipette eingefüllt. Die Stickstoffkapillare wird aufgesetzt, das S-Rohr, mit Vorstoß und Schliffreagenzglas (8ml) als Kühlfalle, angesetzt. Der Destillierkolben wird in ein warmes Luftbad gestellt (Kupfertopf mit Deckel, Dreifuß und Bunsenbrenner). Die Temperatur wird auf etwa 90 °C einreguliert. Der Stickstoffstrom wird mit einer Gaschromatographie-Stahlsäule als Reduzierkapillare auf etwa 50ml/min. begrenzt. Die Kühlfalle besteht aus einem Dewargefäß, gefüllt mit Trockeneis u. Aceton (-80°C). Zum Herauslösen der Fraktion nach Destillation, trennt man Kolben und Kondensationsrohr, füllt 5ml Aceton p.a. ein, verschließt mit einem Schliffstopfen und schüttelt vorsichtig. Anschließend entfernt man Vorstoß und Kondensationsrohr und rotiert das Lösungsmittel vorsichtig ab. Das Destillat befindet sich nun im Schliffreagenzglas. Dies dient zur weiteren Verarbeitung (Methylierung) als Reaktionsgefäß.

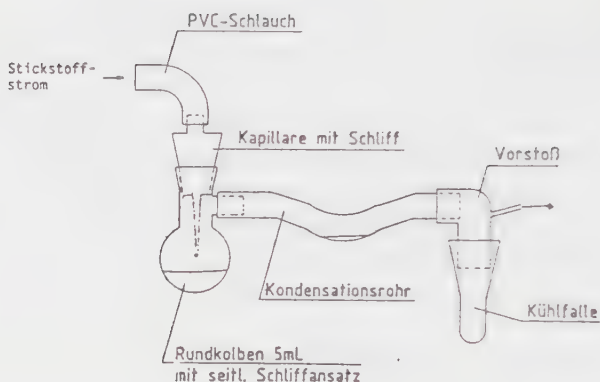


Abb.4 : Modifizierter Säbelhalskolben zur schonenden Destillation kleiner Substanzmengen im Stickstoffstrom:

8. Hochdruckflüssigchromatographie

Systeme:

- für die Arbeiten an Hafer und Flughafer wurden zwei Waters-Pumpen mit Hochdruckgradientenmischer verwendet.
- für die Arbeiten an Hagebutten wurde eine Kratospumpe mit Niederdruckgradientenmischer verwendet.

Chromatographiesäulen:

Bondapak RP-18, (Waters); LichroPrep RP -8 (Merck); jeweils 250x5mm.

Detektor:

UV-Detektor, 215/220nm.

mobile Phase:

Für Ionenpaarchromatographie: Low PIC A (Waters), 1%ige wässrige und 1%ige methanolische Lösung. Für alle anderen Trennungen wurde 1%ige wässrige und 1%ige methanolische ortho-Phosphorsäurelösung verwendet.

Gradient:

Bei allen Analysen wurden stufenlose Gradienten von 0 - 100% methanolische Lösung gefahren.

Flußrate:

1,5 ml/min, analytisch
3,5 ml/min, präparativ.

Einspritzmenge:

variabel, 0,5 µl - 100 µl.

Wiedergewinnung der Proben:

Die Wiedergewinnung der Proben geschieht über zweimaliges Ausschütteln der einzelnen Fraktionen mit je 5 ml frisch destilliertem, peroxidfreiem Diethylether. Dazu wird die wässrige Lösung mit Schwefelsäure angesäuert, (bis pH= 2,0). Fraktionen mit höherem Methanolanteil müssen vor Ausschütteln solange mit bidestilliertem Wasser verdünnt werden, bis eine Phasentrennung erfolgt.

9. Chromatographie an LichroPrep-Si-60

Säule: Pasteurpipette

Füllhöhe: 5cm, $\approx$ 1g trockenes Säulenmaterial.

Verarbeitung: Das trockene Säulenmaterial wird mit Hexan/ Essigsäureethylester (50:50) aufgeschlämmt und im Exsikkator vorsichtig entgast (Wasserstrahlvakuum). Nach Füllen der Säule wird mit ca. 10ml Hexan äquilibriert.

Die zu trennenden Gemische (Methylester) werden in wenig Hexan/ Essigsäureethylester (50:50) gelöst und mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgetragen. Die Elution beginnt mit 2ml reinem Hexan. Danach erhöht man die Polarität des Laufmittels in 2ml-Schritten um jeweils 5%-Anteile an Essigsäureethylester. Das Eluat wird in Portionen zu 0,5 ml in Mikroprobengläschen auffangen und verschlossen.

B. Analytischer Teil

1. Biotest

Pflanzenmaterial: *Amaranthus caudatus* (siehe A 1.4.)

je Test wurden 25 Samen/ Schälchen angesetzt.

Testbehälter : Glaspetrischalen 0 4,5cm einlagig mit
Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr. 602 H)
ausgelegt.

Testvolumen : 1ml

Testbedingungen : Brutschrank (Fa. Ehret, Modell BK 3108) bei
29 °C, 90% Luftfeuchte.

Als Bezugspunkt für die Hemmaktivität des biologischen Materials dient der Vergleich mit einem "Wasserwert". Anstatt in einer Testlösung, wird die Keimung des Amaranthussamens in destilliertem Wasser untersucht.

Zur Ermittlung der Keimfähigkeit der Amaranthussamen wird der Wasserwert gelegentlich überprüft. Dazu werden jeweils 3 bis 10 Wasserwerte angesetzt und der Mittelwert gebildet. Bei Nachlassen der Keimrate unter 90% wird frisches Saatmaterial beschafft.

2. Gaschromatographie

2.1. Gaschromatographie mit gepackter Säule

2.1.1. Technische Bedingungen

Gerät: Carlo Erba 23100 mit FID 160
Säule: Glassäule 1,5m x 0,2cm
Stat. Phase: Chromosorb 101, 100/120 mesh, Manville.
Inj. Temp.: 125 °C
Det. Temp.: 230 °C
Temp. Programm: 60 - 190 °C; 7 °C/min.
Probenmenge: 2µl, Standards als 0,1%ige Lösung

2.1.2. Vorbereitung der stationären Phase, Füllen der Glassäule

Etwa 10g Chromosorb 101 werden bei Raumtemperatur mit Aceton, dann mit getrocknetem Ether gewaschen, anschließend im Trockenschrank über Nacht bei 105 °C getrocknet. Eine leere Glassäule (1,5m x 0,2cm) wird am Ende mit etwas silanisierter Glaswolle verschlossen. Dieses Ende schließt man an ein Wasserstrahlvakuum an. Die Säule wird nun mit dem vorbehandelten Chromosorb 101 gleichmäßig gefüllt. Der Säulenanfang wird ebenfalls mit silanisierter Glaswolle verschlossen. Vor Beginn der Probeneinspritzung wird die Säule über 12-18 Stunden bei Maximaltemperatur (230 °C) konditioniert. Zur Kontrolle läßt man das Temperaturprogramm mit betriebsbereitem Detektor einmal durchlaufen. Um möglichst symmetrische Peaks zu erhalten, spritzt man vor Beginn eines Analysentages zwei bis dreimal je 5µl einer 5%igen Metaphosphorsäurelösung ein. Falls im Laufe der Analysen die einzelnen Peaks immer breiter werden und die Grundlinie ansteigt, wird diese Behandlung wiederholt. Nach etwa 100 Injektionen muß der obere Teil der Füllung mitsamt der Glaswolle ausgetauscht werden.

2.2. Gaschromatographie mit Glaskapillarsäule

Gerät: Carlo Erba 23100 mit FID 160
Säule: Glaskapillare 25m x 0,3mm; OV-1
Inj. Temp.: 225 °C
Det. Temp.: 230 °C
Temp. Programm: 60 - 240 °C; 3 °C/min.
Probenmenge: 1µl, splitlose Injektion.

3. Derivatisierung mit Diazomethan

a) Herstellung von Diazomethan in Diethylether:

In einen 50ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Vorstoß und absteigendem Kühler gibt man eine Lösung von 3g KOH in 5 ml Wasser, 17ml Carbitol (Diethylenglycolmonoethylether) und 5ml Ether. Man erhitzt die Mischung zum Sieden in einem Wasserbad mit 75 °C. Sobald die Mischung zu sieden beginnt, tropft man eine Lösung von 10g N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid in ca. 80ml Ether gelöst, innerhalb einer 1/4 Stunde zu. Während der Umsetzung und kontinuierlicher Destillation muß die Mischung mit einem Magnetrührer bewegt werden und die Vorlage ist gut zu kühlen.

b) Derivatisierung:

Die zu methylierende Fraktion wird portionsweise mit der gekühlten Diazomethanolösung versetzt, bis die Stickstoffentwicklung nachläßt und die gelbe Farbe der Reaktionslösung erhalten bleibt. Man läßt noch etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur nachreagieren und entfernt dann die überschüssige Diazomethanolösung im Stickstoff-Strom.

Da sowohl die Ausgangsprodukte als auch Diazomethan canzerogen sind, sind alle Umsetzungen im Abzug durchzuführen!

4. Gaschromatographie/ Massenspektrometrie:

Alle GC/MS- Untersuchungen wurden bei Herrn Dr. W. Schäfer am Max- Planck Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

4.1. Untersuchung von Flughafer

Gerät:	Carlo Erba Fractovap 2110 für Split und Splitlosinjektion
Säule:	OV-1701, Quarzkapillare, 30m, Chrompak
Gase:	2ml/min: Helium; 1,8ml/min: Wasserstoff

Ionisations-
energie: 70 eV
Temperatur: Injektor: 150 °C; Säule: 50 °C isotherm 10
Minuten, dann 10min bei 120 °C belassen.
Scan: 20 Spektren/min.

4.2. Untersuchung von Saathafer

Gerät: Carlo Erba Fractovap 2110 für Split und
Splitlosinjektion
Säule: CPSil 5, Glaskapillare, 25m, Chrompak
Gase: 1,15ml/min.: Helium; 1,0ml/min: Wasserstoff
Ionisations-
energie: 70 eV
Temperatur: Injektor: 200 °C; Säule: 50 - 240 °C;
3 °C/min.
Scan: 24 Spektren/min.

5. Chemikalien/Reagenzien

Fa. Merck, Sigma, Waters, Alltech Europe.

6. Maßgefertigte Glasgeräte

Fa. Greiner und Gaßner, München

IV. ERGEBNISTEIL

A. Saathafer

1. Wässriger Rohextrakt

Zur Herstellung des wässrigen Rohextrakts aus Saathaferspelzen wurden jeweils 400g Pelzen in einer modifizierten Soxhlet-Apparatur mit 2l Wasser heiß extrahiert. Der so erhaltene Rohextrakt, im Mittel 1.850ml, wurde zunächst dem Amaranthuskeimtest unterworfen. Dazu wurden 1ml des wässrigen Rohextrakts und 1ml bidest. Wasser als Vergleichswert getestet. Der wässrige Rohextrakt unterdrückte das Wachstum der Amaranthuskeimlinge vollständig. In den Biotests wird dieses Ergebnis als 100%ige Hemmwirkung bezeichnet. (Zur Beurteilung des Biotests vgl. IV.12).

2. Aufteilung des Rohextrakts mittels Etherextraktion in Fraktionen bei verschiedenen pH-Werten.

Bereits früher (Karl, 1978; Lohaus, 1981) wurde festgestellt, daß vor allem die bei pH-1 mit Ether ausgeschüttelte Fraktion eines Saathaferspelzenextrakts im Biotest eine starke keimungshemmende Wirkung auf sowohl mono- als auch dikotyle Pflanzen ausübt. Hier sollte der Kreis der in Frage kommenden Verbindungen weiter eingegrenzt werden und möglicherweise einzelne chemische Strukturen bestimmt werden.

Zur Abtrennung von Neutralstoffen war eine Vorextraktion bei pH-7 erforderlich.

2.1. Etherextraktion bei pH-7

Der wässrige Rohextrakt weist einen pH-Wert von 5,5 auf. Zur Extraktion bei neutralem pH mußte zunächst neutralisiert werden. Hierzu wurde eine gesättigte Natriumbicarbonatlösung ver-

wendet. Der auf pH-7 eingestellte Rohextrakt wurde mit Diäthyläther in einem Perforator erschöpfend extrahiert. Die Neutralfraktion wurde vom Lösungsmittel befreit, der Äther dabei zurückgewonnen. Diese Fraktion wurde nicht weiter untersucht und deshalb verworfen.

2.2. Etherextraktion bei pH-1

Die verbliebene wässrige Lösung wurde mit H_2SO_4 auf einen pH-Wert von 1,0 gebracht. Die sauren Stoffe wurden nun mit einem Perforator erschöpfend extrahiert.

Durch den Gebrauch zweier Soxhlet-Apparaturen sowie zweier Perforatoren konnte ein fast kontinuierliches Verfahren zur Gewinnung der pH-1 Fraktion erreicht werden, bei dem es ohne längere Wartezeiten möglich war, größere Mengen des Ausgangsmaterials für die weiteren Untersuchungen bereitzustellen. Nachdem das Lösungsmittel entfernt war, wurden die pH-1 Extrakte gesammelt, in wenig Methanol gelöst im Tiefkühlfach über längere Zeit aufbewahrt. Nach mehrmonatiger Lagerung wurde ein Biotest durchgeführt. Die 1-fache Konzentration (vgl. IV.12.) hatte immer noch 100%ige Hemmwirkung.

3. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20

Das bei der pH-1 Extraktion erhaltene Substanzgemisch wurde durch Chromatographie an Sephadex LH-20 weiter aufgetrennt. Bei Sephadex-LH-20 handelt es sich um ein dreidimensional vernetztes, teilweise mit Propylgruppen verethertes Dextrangel. Die Chromatographie mit diesem Material stellt eine teilweise Verteilungs- und Absorptionschromatographie dar. Wie schon an anderer Stelle gezeigt werden konnte (Lohaus, 1981), ist das Sephadexgel gut geeignet, Naturstoffgemische in Fraktionen unterschiedlicher chem. Charakteristik aufzutrennen und besonders Stoffe mit phenolischem Charakter bei dem hier verwendeten Elutionsmittel (Wasser) ausreichend lang zurückzuhalten. Phenolische Bestandteile ließen sich mit einem zunehmenden Methanolanteil von der Säule eluieren.

Phenolische Stoffe sind an anderer Stelle bereits beschrieben (Stom, 1981; Börner, 1955; Hermann, 1958; Jayachandian, 1975). Ihre inhibitorische Wirkung ist nur in höheren Konzentrationen bemerkbar (Karl, 1978). Sie läßt unterhalb einer Konzentration von 10^{-3} mol/l nach. Andere bereits beschriebene Inhibitoren wie z.B. Abscisinsäure sind in Konzentrationen von 10^{-6} mol/l noch wirksam (vgl. Versuche mit synthetischer ABA unter IV C, Abb. 39). Das hier verwendete Elutionsmittel (Wasser) verändert nicht die Keimrate im Amaranthuskeimtest. Es dient als Wachstumsmedium für den Wasserwert.

Der Verlauf der Elution wurde mittels eines Durchflußspektromonitors bei einer Wellenlänge von 240nm verfolgt (Abb.5). Das Elutionsdiagramm ist jedoch nicht korrelierbar mit dem Vorhandensein von biologisch aktiven Verbindungen; es diente lediglich als Orientierungshilfe für die spätere Zusammenfassung der hemmaktiven Fraktionen. Das Elutionsdiagramm zeigt sechs voneinander unterscheidbare Fraktionen, A bis F. Im Biotest (Tab.1) waren die Fraktionen A, B und E hemmaktiv. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Beobachtungen (Lohaus, 1981). In Fraktion E sind es phenolische Substanzen, die die Keimung des Amaranthusamen unterdrücken.

Tab. 1: Hemmaktivität eines Saathaferspелzenextrakts nach LH-20-Chromatographie, vgl. Abb.5; Amaranthuskeimtest mit 25 Samen / Schälchen

Fraktion: Hemmung (%) 2,5-fache Konzentration

A	100
B	86
C	36
D	12
E	88
F	12
Wasserwert	0

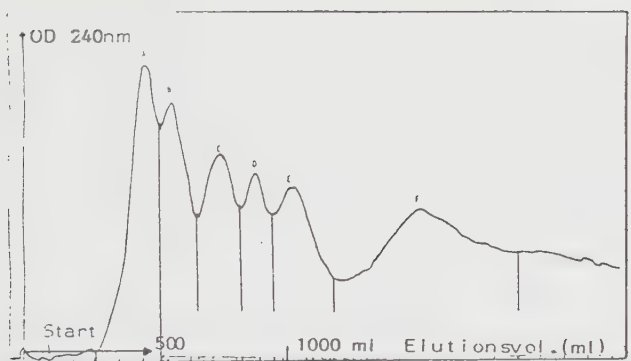


Abb.5 : Elutionsdiagramm der Auftrennung des pH-1 Extrakts aus 300g frischen Saathaferspelzen an Sephadex-LH-20. Elutionsmittel: H_2O ; Durchflußrate: 35ml/h; Detektion: Spektromonitor, UV 240nm. Die senkr. Linien zeigen die Fraktionierung A-F.

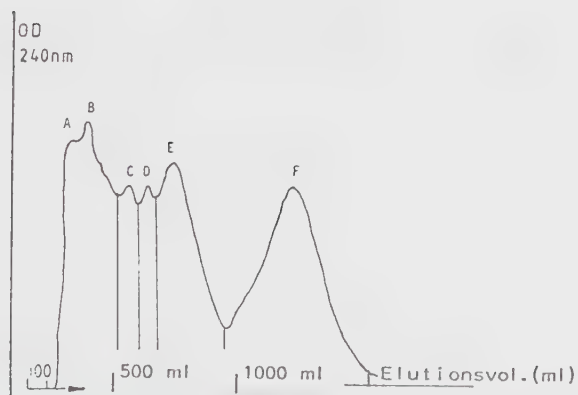


Abb.6 : Elutionsdiagramm der präparativen Auftrennung eines Etherextraktes von 1 Jahr gealterten Spelzen (Bed. wie Abb.5).

Abb.5 zeigt das Elutionsdiagramm der Elution eines frischen Spelzenextrakts, Abb.6 zeigt das Elutionsdiagramm von etwa 1 Jahr alten Spelzen. Man erkennt, daß besonders der Bereich A unterschiedlich beschaffen ist. Im Vergleich zu Abb.5 hat A in Abb.6 deutlich geringere Extinktionswerte. Die Hemmaktivität der Fraktion A aus Abb. 6 im Vergleich zu A in Abb. 5 war etwas geringer.

Für die weitere Präparation wurden die Eluate von Fraktion A und B vereinigt; das Volumen beträgt dann etwa 450ml. Der Geruch ist frisch, obstartig, der pH-Wert liegt bei 2,8. Die Eluate verschiedener Chromatographien wurden zunächst gesammelt, so daß bei der weiteren Präparation immer ein Gemisch verschiedener Aufarbeitungen vorlag.

4. Gefriertrocknung der hemmaktiven Fraktionen

Zur weiteren Untersuchung wurden die Fraktionen A u. B vereinigt und gefriergetrocknet, dazu erst im Methanolbad gekühlt, dann im Vakuum getrocknet. Als Rückstand erhielt man eine viskose Flüssigkeit mit hygroskopischen Eigenschaften, gelbbrauner Farbe und stechendem, buttersäureähnlichem Geruch. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die gefriergetrockneten Eluate verschiedener Chromatographien gesammelt und bei -20 °C in Methanol gelöst aufbewahrt.

5. Derivatisierung der Hemmfraktion

Zur weiteren Auftrennung durch Destillation und Identifizierung durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie wurden die vereinigten Fraktionen A/B mit Diazomethan in Ether umgesetzt.

Die Methylester von Carbonsäuren mit Hemmaktivität unterscheiden sich in ihrer Hemmwirkung nicht von den underivatisierten Produkten (Karl,1978). Nach Herauslösen der Hemmstoffe aus der Destillationskapillare mit Aceton p.a. und Entfernen des Lösungs-

mittels im Vakuum, läßt sich die Derivatisierung einfach und schnell durchführen. Zur Methylierung wurde die wasserfreie Hemmfraction nach Gefriertrocknen mit einer etherischen Diazomethanolösung versetzt (vgl. dazu III B 3.). Anschließend ließ man noch eine Weile nachreagieren. Hierauf wurde das Lösungsmittel entfernt. Das überschüssige Diazomethan zerfällt beim Abblasen des Ethers zu Stickstoff und Carben. Carben polymerisiert und bildet einen gelb bis braunen Rückstand im Reaktionsgefäß.

6. Horizontaldestillation

Eine weitere Reinigung wurde durch die Horizontaldestillation erreicht.

Die Destillation mit dem automatischen Horizontaldestillator (vgl. Abb.3) bietet die Möglichkeit, kleinere Substanzmengen in schonender Weise "destillativ" aufzutrennen (vgl. III A 7.1.). Gerätetechnisch ist diese Methode zwischen Gaschromatographie und herkömmlicher Destillation einzuordnen. Bei der Untersuchung von Naturstoffgemischen wurde das Gerät von Brunner (1978) eingesetzt, um Aromastoffe aus geröstetem Kakao zu isolieren und zu charakterisieren.

Bei der Untersuchung von Hafer und Flughafer wurde diese Apparatur hier erstmalig eingesetzt.

Wie bei jedem Kaskaden oder Multiplikationsverfahren müssen auch hier die Phasen flüssig/gasförmig im Gegenstrom in Kontakt gebracht werden. Bei der Horizontaldestillation benötigt man grundsätzlich weniger Material als bei einer senkrecht stehenden Trennsäule, die ja von oben bis unten benetzt sein muß. Führt man jeweils die Wand der Austauschvorrichtung zum Verdampfungspunkt zurück, so benötigt man statt des Flüssigkeitsstroms der Säule nur einen geringen Flüssigkeitsbeschlag. Außerdem muß man der Austauschvorrichtung ein von außen zugeführtes passendes Wärmegefälle geben, - thermodynamische Bedingung für eine Fraktionierung, - damit der Dampf keine Erwärmungsarbeit zu leisten braucht. Schließlich ist noch dafür zu sorgen, daß die gas-

förmigen Stoffe sich nur in die Richtung des aufgezwungenen Wärmegefälles bewegen und nicht infolge von Diffusionskräften in umgekehrter Richtung, was die eben erfolgte Trennung rückgängig machen würde. Dieser Effekt wird durch zwei Maßnahmen erreicht: der geringe Querschnitt der längs zum Wärmegefälle angeordneten Kapillarkolonne unterdrückt weitgehend die Diffusions- und Turbulenzerscheinungen. Durch die Verwendung eines Trägergases, welches in Richtung des Wärmegefälles strömt, wird der Stofftransport in die gewünschte Richtung wirksam unterstützt (Brunner, 1978).

Die Hemmfraction A/B, erhalten nach Sephadexchromatographie, wurde nach Gefriertrocknen und Derivatisieren in kleinen Portionen über dieses Destillationsverfahren getrennt. Die Destillation erfolgte in einem Temperaturbereich von 150 - 70 °C und dauerte 2 1/2 Stunden. Nach etwa 20 Minuten bei 150 °C war die Hauptmenge aus dem nicht sichtbaren Bereich des Schiebeofens hervorgewandert. Durch ein Sichtfenster konnte man den rotbraunen Rückstand erkennen (höhermolekulare Kondensationsprodukte). Die Temperatur wurde nun auf ein Gefälle von 120/90 °C heruntergeregelt, der Schiebeofen in Betrieb genommen. Nach etwa 1 Stunde wurde nochmals heruntergeregelt auf 90/70 °C. Als Ergebnis der Horizontaldestillation erhielt man folgende Fraktionen (vgl. Abb.7):

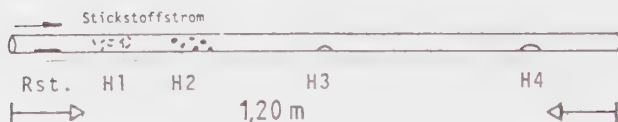


Abb.7 : Horizontaldestillation, (vgl. Abb.3) von 30mg Lyophilisat aus den vereinigten Fraktionen A u. B, (vgl. Abb. 6).

Das Glasrohr wurde nach Abkühlen entsprechend der sichtbaren Auftrennung (siehe Abb.7) zerschnitten und die Bestandteile mit Aceton p.a. aus den Kapillaren herausgelöst. Mit den erhaltenen Fraktionen wurde ein Amaranthuskeimtest (vgl. IV.A.12.) durchgeführt. Eine keimhemmende Wirkung fand sich in Fraktion H4, (Tab.2) und im Rückstand, der auch eine Hemmwirkung aufwies. Dieser hatte jedoch für die weiteren Untersuchungen keine Bedeutung, da hier wahrscheinlich höhermolekulare Verbindungen mit phenolischem Charakter vorlagen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

Zum Keimtest wurde die 5-fache Konzentration zum Volumen des wässrigen Rohextrakts verwendet (vgl. IV.A.12.). In Fraktion H4, ebenso im Rückstand beobachtete man Totalhemmung. Bei 1,25facher Konzentration wurde ausschließlich in H4 Totalhemmung des Amaranthuswachstums beobachtet.

Tab. 2: Ergebnis der Horizontaldestillation (vgl. Abb.7); Hemmaktivität (%); Amaranthuskeimtest mit 25 Samen/Schälchen.

5- fache Konzentration zum Rohextrakt.

Fraktion	Hemmung
- Rst: Rückstand	20
- H1: weißer Belag	0
- H2: gelbe Kristalle	0
- H3: gelbes Öl	0
- H4: fast farbloses Öl	100

7. Kurzwegdestillation im Stickstoffstrom

Als Alternativmethode zur Horizontaldestillation wurde ein weiteres, weniger aufwendiges und zeitsparendes Destillationsverfahren durchgeführt (vgl. dazu III A 7.2.). Nachdem festgestellt worden war, daß sich die Hemmwirkung der nach Sephadexchromatographie erhaltenen Fraktionen nach der Horizontaldestillation in der am leichtesten flüchtigen Fraktion befand (H4), lag die Überlegung nahe, daß die Aufteilung der gefriergetrockneten Fraktion in zwei Teile ausreichen sollte, um den Hemmstoff zu reinigen.

Im Schenkel des S-Rohres (Abb.4) erschien nach etwa 1 Stunde ein hellgelber bis farbloser Tropfen. Die übrigen Bestandteile blieben im Kolben zurück. Der hellgelbe Tropfen entspricht der H4 nach der Horizontaldestillation und wurde nach Herauslösen mit Aceton weiterverwendet. Die Zuordnung geschah durch Biotest und Gaschromatographie

Vorteilhaft bei diesem Destillationsverfahren ist, daß jeweils ca. 800mg, das entspricht der gesamten Fraktion A u. B. einer Aufarbeitung) der nach Sephadexchromatographie und Gefriertrocknung gewonnenen Hemmfraktion destilliert werden konnte, bei der Horizontaldestillation waren es jeweils nur 30mg. Der Gehalt an Lösungsmittelresten war unerheblich.

8. Hochdruckflüssigchromatographie

Zur Auftrennung der Fraktion H 4, gewonnen durch die Horizontaldestillation des mit Diazomethan gewonnenen Methylestergemisches (vgl. Abb.9, Gaschromatogramm der H 4), wurde eine präparative HPLC-Trennung durchgeführt. Wie bei der Sephadex-chromatographie bereits erwähnt, bedeutet eine Fraktionierung anhand des Elutionsdiagramms nicht, daß hier eine gelungene Abtrennung bezüglich der Hemmstoffe erfolgte. Die eluierten Fraktionen wurden im 2-Minuten-Zeittakt geschnitten und so wurden 10 Fraktionen unterschieden. (Abb.8) Für den Biotest und die weiteren analytischen Maßnahmen wurde das wässrig-methanolischen Eluat mit Diethylether ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und in Hexan/Essigsäureethylester (50: 50) aufgenommen. Bei Fraktionen mit höherem Methanolanteil war es zunächst notwendig, mit Wasser zu verdünnen, bis eine Phasentrennung erfolgte. Nun wurden die Fraktionen auf Hemmaktivität im Biotest geprüft (Tab.3):.

Tab.3 Ergebnis des Biotests der HPLC Fraktionierung.

Testmaterial	Hemmwirkung (%)
F 1	0
F 2	4
F 3	12
F 4	100
F 5	4
F 6	100
F 7	0
F 8	12
F 9	60
F10	0
Wasserwert	0

Für den Biotest wurde eine Verdünnung gewählt, die der 1,25-fachen Konzentration, bezogen auf das Volumen des wässrigen Rohextrakts.

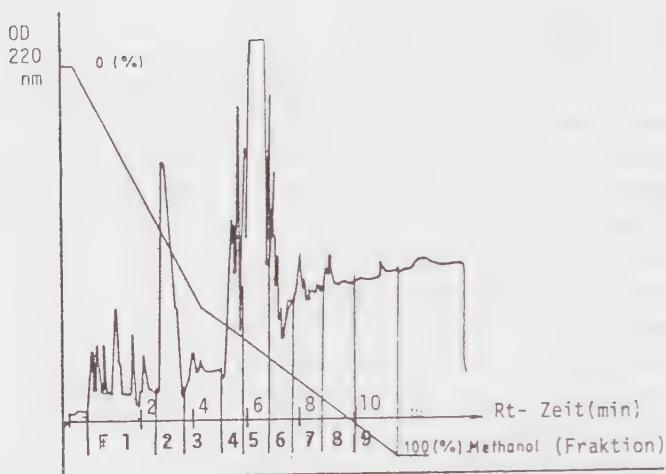


Abb.8 : HPLC-Trennung der Hemmfraction H4 nach Horizontaldestillation. Säule: LichroPrep RP-8, 250 x 20mm, Det.: UV 210nm; Die Fraktionen Nr.4,6,u.9 zeigten Hemmaktivität. (vgl.Tab.3)

9. Gaschromatographie

Die Untersuchungen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Hemmfractionen erfolgte über die Kapillargaschromatographie bzw. über die Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie. Das Ergebnis des nach Hochdruckflüssigchromatographie durchgeführten Biotests zeigte, daß sich in den Fraktionen F4, F6 und F9 Hemmstoffe befinden. Zur qualitativen Untersuchung der in den hemmaktiven Fraktionen vorhandenen Substanzen wurde eine Gaschromatographie an einer OV-1 Glaskapillare durchgeführt. Die Abb. 9 zeigt ein Gaschromatogramm der Esterfraction H4 vor Hochdruckflüssigchromatographie. Die Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen, daß sich in den Fraktionen hauptsächlich Substanzen befanden, die bei einer Säulenofentemperatur von 139 °C eluiert wurden. Es handelt sich um die Peaks 1, 2 u. 3 in den Abbildungen. Die Hauptkomponente in F 4

und F 9 hat die gleiche Retentionszeit. Möglicherweise lag hier eine Verschleppung durch die HPLC vor. Chromatographiesäulen mit umgekehrter Phase (reversed phase), wie das hier verwendete RP-8 Material, sind häufig nicht vollständig belegt. Es befindet sich immer noch ein gewisser Anteil des nicht derivatisierten Kieselgels in der Säulenfüllung. Durch die unterschiedlich polaren Eigenschaften des Materials war es möglich, daß ein Teil der Substanz 2 erst später von der Säule eluiert wurde.

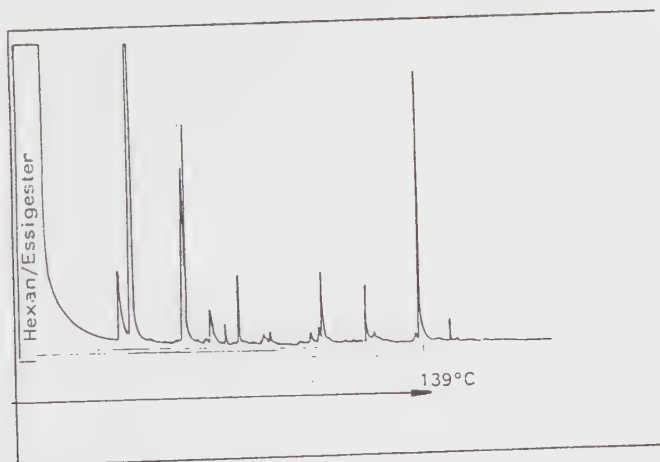


Abb.9 : Kapillargaschromatogramm der Hemmfraktion H4 nach Horizontaldestillation (vgl. Abb.8); Säule: OV-101, 25m; Temp.Program: 60-240 °C; 3°C/min.(Weitere GC- Bedingungen: siehe III B 2.).

10. Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Für die gaschromatographische Auftrennung bei der GC/MS-Kopplung wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie bei der Gaschromatographie unter 9. So wurden vergleichbare Retentionszeiten erzielt. Abb. 13 zeigt das Kapillargaschromatogramm der GC/MS-Untersuchung (vgl.III B.4). Die massenspektrometrische Untersuchung lieferte für die Substanzen 1 und 3 die gleichen Massenspektren; die Vermutung lag nahe, daß es sich um die-

selbe Verbindung handeln konnte; die Substanz 2 in den Fraktionen F4 und F9 zeigte ebenfalls das gleiche Massenspektrum (Abb.15, 17 u. 19).

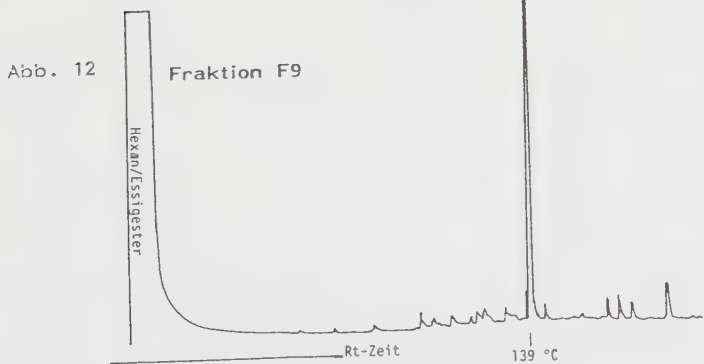
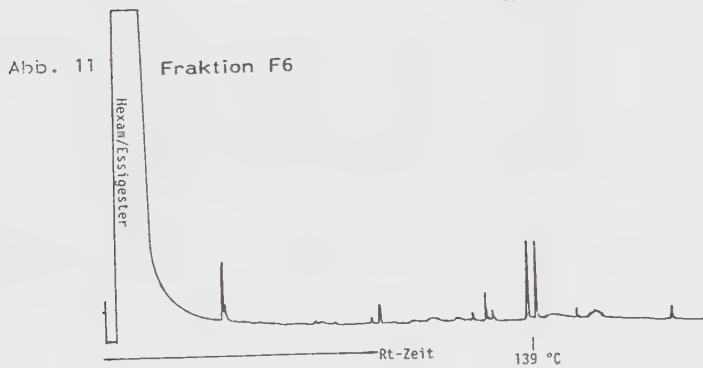
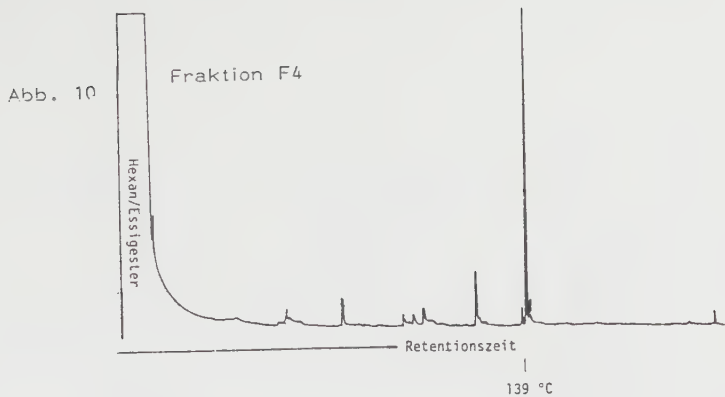


Abb.10,11, u.12: Kapillargaschromatogramme der Hemmfraktionen F4, F6, und F9 nach Hochdruckflüssigchromatographie der Fraktion H4 (vgl. Abb.8); technische Bed. wie Abb. 9.

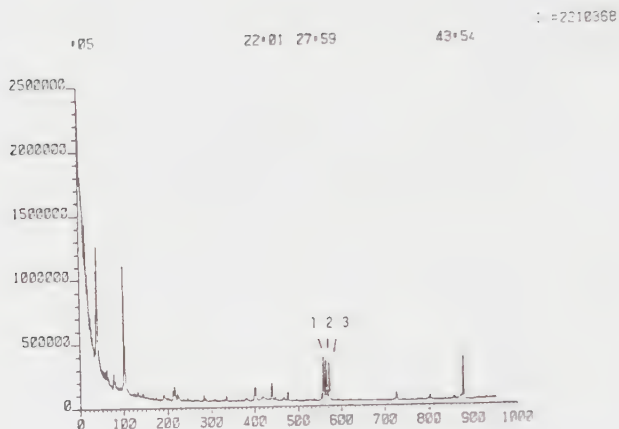


Abb.13 : Kapillargaschromatogramm der GC/MS-Untersuchung der Hemmfraction (F4, Abb.8) (techn. Bed. wie Abb. 9)

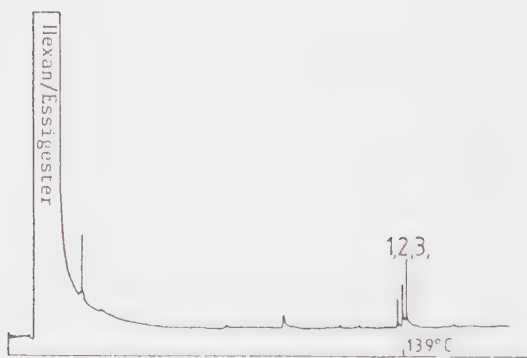


Abb.14 : Kapillargaschromatogramm der synth. Vergleichssubstanzen: (erythro/ threo-Dihydrohämatinsäure und Azelainsäuremethylester; Säule: Glaskapillare OV 101, 25m (Temperaturprogramm u. weitere GC-Bedingungen siehe III B 2)

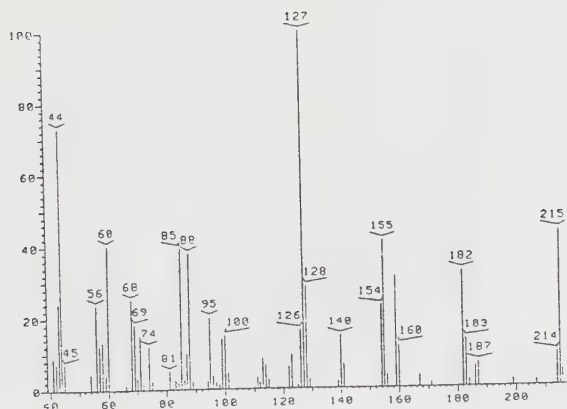


Abb. 15 : 70 eV- Massenspektrum der Substanz 1 aus Abb. 13

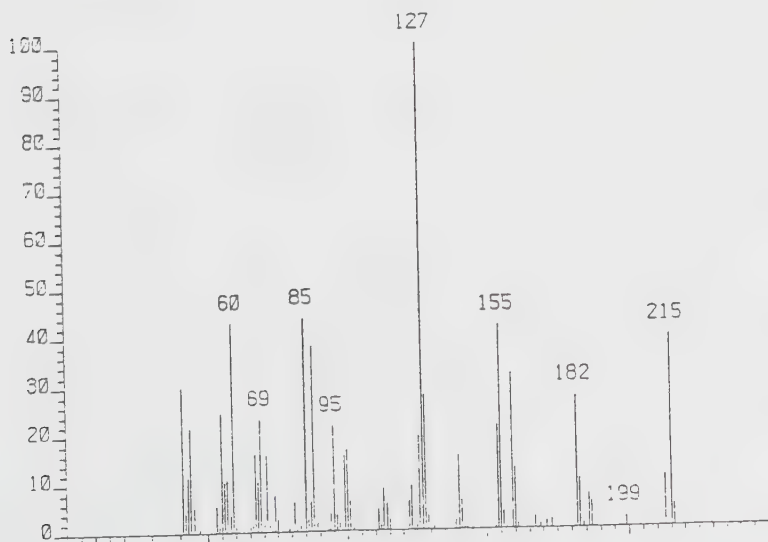


Abb. 16 : 70eV-Massenspektrum des synthetischen Dihydrohämatin-säuretrimethylesters.

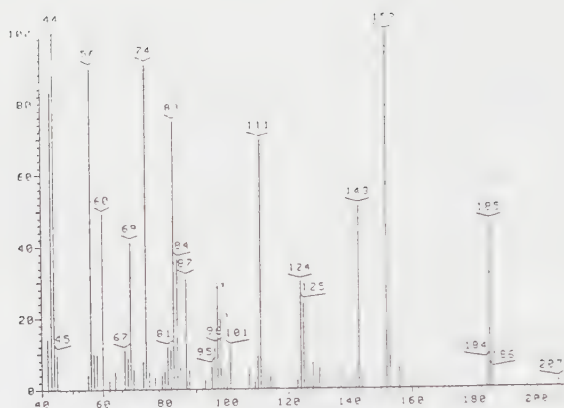


Abb. 17 : 70 eV- Massenspektrum der Substanz 2, aus Abb. 13

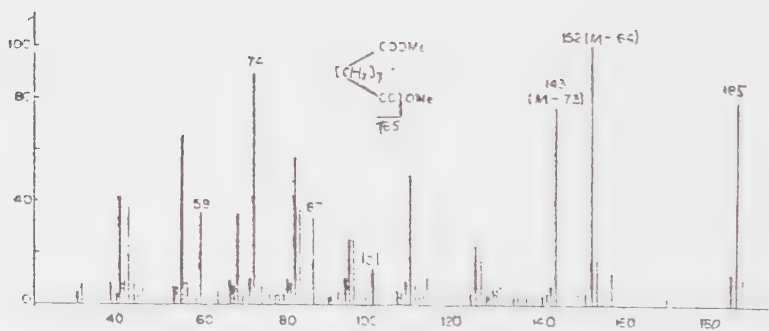


Abb. 18 : 70 eV-Massenspektrum des synthetischen Nonandimethylesters

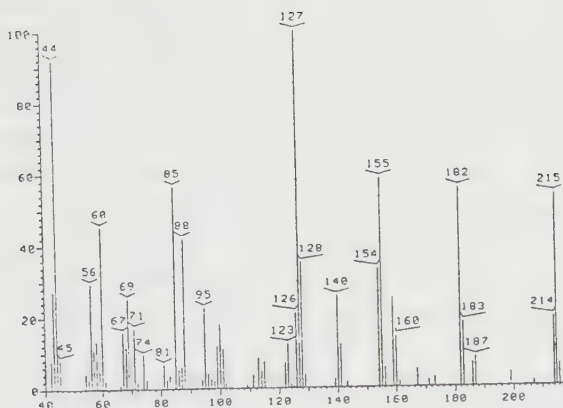


Abb.19 : 70 eV- Massenspektrum der Substanz 3, aus Abb.13

11. Strukturbestimmung der Hemmsubstanzen

Die massenspektrometrische Analyse von Substanz 3 (Abb.13) deutete auf das Vorliegen von Dihydrohämatinsäure (Lohaus, 1981) hin.

Man findet in den Spektren (Abb. 15,- 19) die typischen Schlüsselbruchstücke für Carbonsäureester: $m/z 59$ für $(COOCH_3)^+$ und $m/z 74$. Ersteres Bruchstück entsteht bei der homolytischen Spaltung zwischen Carbonylgruppe und Rest R^* (α -Spaltung). Die Bildung des Bruchstücks $m/z 74$ erklärt sich durch die McLafferty-Umlagerung von Estern mit α -ständigem H-Atom. Aufgrund der Aufarbeitung sollten basische Verbindungen auszuschließen sein. Substanzen, die nur C, H und O enthalten, können nur geradzahliges Molekulargewicht haben. Demzufolge kann das intensive Signal bei $m/z 215$ nicht das Signal des Molekülpeaks sein. Wie aus verschiedenen Untersuchungen an Carbonsäureestern ersichtlich (Spiteller, 1979; Lohaus, 1981), weisen diese in der Regel keine M^+ -Peaks auf. Je nach Struktur beobachtet man als Signal mit der höchsten Masse M^+-OCH_3 oder $M^+-COOCH_3$. Für die Substanz 3 (Abb.15-18) ergibt sich daraus ein mögliches Molekulargewicht von 246 ($215 + OCH_3$) bzw. 274

(215 + COOCH₃) Eine Substanz mit m = 246 wurde bereits als Hemmstoff identifiziert (Lohaus, 1981). Die Elementarzusammensetzung C₁₁H₁₈O₆ wurde zusätzlich durch hochauflösende Massenspektrometrie bewiesen. Es handelte sich dabei um 1, 3, 5,-Pentatricarbonsäure (Dihydrohämatinsäure). Durch Vergleich der Massenspektren und der Retentionszeiten nach Zuspritzen der synthetischen Vergleichssubstanz zur natürlich isolierten Hemmfraction, konnte die Identität der Substanzen gesichert werden. Die Abbildung 20 auf S.43 zeigt ein Zerfallschema für Dihydrohämatinsäuretrimethylester (Lohaus,1981).

Für Substanz 2 (Abb.17) wurde nach oben beschriebener Interpretationsweise ein Molekulargewicht von 216 (M⁺-59) diskutiert. Auf den Verlust von -OCH₃ (-31) erfolgt beim massenspektrometrischen Zerfall in der Regel die Abspaltung von CO(-28). Das bedeutet für die hier zu suchende Struktur, man müßte ein Signal 185 - 28 = 143 erhalten (vgl. Abb.15 und 18). Sollte es sich bei der gesuchten Verbindung um einen Carbonsäureester mit unverzweigter C-Kette handeln, müßte auch ein "McLafferty-ion" bei m/z=74 zu erwarten sein, was in der Tat auch mit großer Intensität erscheint. Als charakteristisches Signal gilt auch das Signal bei m/z= 152 (bei vorliegendem Spektrum mit 100 % Intensität). Die Deutung: M⁺-64 ist ein Hinweis auf Dicarbonsäuren und bedeutet die Abspaltung von 2 x Methanol. Durch Vergleich der bekannten Massenspektren (MS-Data Katalog) des Molekulargewichts mit Molekularpeak 216 mit dem Spektrum des Naturstoffs wurde die Struktur eines Nonandicarbonsäuremethylesters wahrscheinlich gemacht. Durch Veresterung von synthetischer Nonandisäure und GC - MS Untersuchung wurde die Struktur bestätigt.

Zur weiteren Untersuchung wurden die vermuteten Substanzen, Pentatricarbonsäure (Dihydrohämatinsäure) und Nonandisäure (Azelainsäure) als synthetische Produkte gemischt und unter gleichen Bedingungen untersucht. Abb. 14. zeigt das Chromatogramm dieses Gemisch²⁵, (vgl. dazu Abb.13, die natürliche Hemmfraction). In den Abb.16 und 18 sind die Massenspektren der synthetischen Verbindungen wiedergegeben.

12. Anwendungen des Amaranthuskeimtests

12.1. Biotest

Die identifizierten Substanzen mußten nun als authentische Produkte auf ihre Hemmaktivität untersucht werden und mit der Gesamthemmwirkung von Haferspелzen verglichen werden. Dazu diente der Keimtest mit *Amaranthus caudatus* (Fuchsschwanz).

Dieser Biotest wurde bereits von Karl und Lohaus (Karl, 1979; Lohaus, 1981) als Detektor zum Auffinden der Hemmaktivität in biologischem Material eingesetzt. Zur Durchführung des Biotests wurde das extrahierte Material in Bezug zum Volumen des wässrigen Rohextrakts verwendet. Nach der Präparation und der quantitativen Bestimmung der Komponenten (mittels Gaschromatographie; Integration über die Peakflächen von identifizierten Substanzen) wurden Standardverdünnungen hergestellt, die entsprechende molekulare Konzentration aufwiesen, so daß festgestellt werden konnte, ob eine Komponente aufgrund ihrer hohen Konzentration allein eine inhibitorische Wirkung auf das Testmaterial ausübte. (Berechnung der Konzentration für den Biotest, siehe 12.2.).

Die Fraktion A/B nach LH-20-Chromatographie wurde in Portionen zu 30mg mittels Horizontaldestillation aufgetrennt. Von den destillierten Fraktionen war die H4 am stärksten hemmaktiv, die Menge betrug ca. 9mg. Für die HPLC wurde die Fraktion H4 in 100µl Methanol aufgenommen.

Nach der Chromatographie wurden die HPLC-Fraktionen mit Diethylether ausgeschüttelt und in 1ml H₂O für den Biotest verwendet. Zur gaschromatographischen Untersuchung wurde nach Ausschütteln mit Diethylether über Natriumsulfat getrocknet und in 1ml Hexan/Essigsäureethylester (50:50) gelöst. So erhielt man Lösungen mit gleicher Hemmstoffkonzentration. Abb. 21 zeigt verschiedene Hemmfraktionen H 4 in den Verdünnungen, wie sie im Biotest eingesetzt wurden und Hemmaktivität zeigten. Hier erkennt man, daß man aufgrund des Gaschromatogramms allein noch keinen Hinweis auf die Hemmstoffe

bekam. Erst nach Anreicherung auf weitaus höhere Konzentrationen, als zum Erreichen einer 100%-igen Hemmwirkung im Amaranthuskeimtest nötig wären, erkennt man auch im Gaschromatogramm, welche Substanzen in biologisch aktiven Fraktionen zu identifizieren sind.

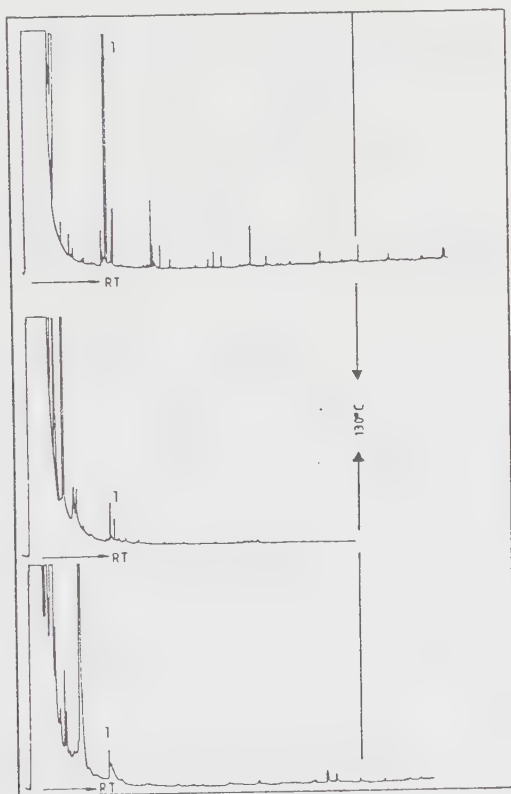


Abb.21: Gaschromatogramme dreier Hemmfraktionen H4 (Bedingungen wie Abb.9). Die Verdünnung für die Gaschromatographie entspricht der Konzentration beim Biotest. Die mit "1" gekennzeichnete Substanz ist Bernsteinsäuredimethylester. Die identifizierten Substanzen sind in dieser Verdünnung nicht mehr erkennbar.

12.2. Berechnung der Konzentration für den Biotest

Für einen Vergleich der Biotestergebnisse war es notwendig, eine Berechnungsgrundlage für die einzelnen Biotests zu erstellen. Die Keimfähigkeit des Amaranthussamens ist auch von der Konzentration der Komponenten abhängig. Der Bezug zum Volumen des wässrigen Rohextrakts diente hier als rechnerische Grundlage. Jede Fraktion der verschiedenen chromatografischen Schritte mußte auf dieses Volumen zurückgerechnet werden, um die Hemmaktivität zu erfassen:

160g Haferspelzen	ergeben 800ml wässrigen Rohextrakt
800ml Rohextrakt	ergeben 1,8g pH-1-Fraktion
1,8g pH-1-Fraktion	ergeben 0,875g Fraktion A/B nach LH-20-Chromatographie.

Dieses Material, daß den Hemmstoff enthielt, wurde in 800ml Wasser aufgenommen und so auf die ursprüngliche, "1-fache" Konzentration gebracht. Für die Biotests nach Horizontaldestillation mußte man berücksichtigen, das nur 30µl des Materials (ca. 1g nach Gefrier-trocknung) zur Horizontaldestillation verwendet wurden. Die Testkonzentration der einzelnen Fraktionen nach der Horizontaldestillation wurde durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Die Ausbeute an der Hemmfraktion H4 nach Destillation betrug ca. 10 mg nach Destillation von 30µl des biologischen Ausgangsmaterials.

12.3. Gehaltsbestimmung der Hemmstoffe im Hafer, Korrelation im Biotest

Die quantitative Bestimmung der Hemmstoffe erfolgte nach einem gaschromatographischen Verfahren. Dazu wurde aus den synthetischen Substanzen jeweils ein Standardgemisch hergestellt und mit den aus Hafer isolierten Fraktionen verglichen. Die Bestimmung erfolgte über die Messung der Peakhöhen. Vorteilhaft bei dieser Methode war die Tatsache, daß die zu bestimmenden Komponenten aus einem Gemisch heraus bestimmt

werden konnten. Zur Bestimmung wurde die Hemmfraktion H4 nach Horizontaldestillation herangezogen, es mußten also die Reinigungsverluste der nachfolgenden HPLC nicht berücksichtigt werden. Demnach ergab sich folgender Gehalt bez. auf 1g Haferspelzen (Trockengewicht):

Dihydrohämatinsäure:	10,9µg erythro-Form
	9,3µg threo-Form
Azelainsäure :	8,4µg

Für den vergleichenden Hemmtest (Tab.4) wurden dann die authentischen Stoffe so verdünnt, daß sie in gleicher Konzentration vorlagen, wie in den Hemmfraktionen F4 - F9.

Tab.4: Vergleich von natürlichen Hemmfraktionen mit authentischen Produkten im Amaranthuskeimtest

Substanz	Hemmwirkung (%)	
	1. Tag	2. Tag
Fraktion 4	100	52
Fraktion 6	100	96
Fraktion 9	100	92
Azelainsäure		
c = $1,88 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$	100	52
Azelainsäure		
c = $3,05 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$	100	92
Dihydrohämatinsäure		
c = $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ (erythro)	96	76
Dihydrohämatinsäure		
c = $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$		
(erythro und threo)	100	88

Die gleichen Lösungen wurden nochmals 1:10 verdünnt getestet. Hier lag die Hemmwirkung einheitlich bei nur noch 20% in allen untersuchten Fraktionen.

12.4. Biotests mit verschiedenen "Cocktails"

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse, bei denen eine inhibitorische Wirkung auf Keimung und Wachstum durch Carbonsäuren mit relativ kurzer Kettenlänge festgestellt wurde (Schildknecht, et al, 1971; Iwanami, et al, 1979) war zu überlegen, ob nicht beliebige Carbonsäuren, auch einen Beitrag zur Hemmaktivität in Saathaferspелzen leisten. Es wurden deshalb Cocktails synthetischer Carbonsäuremethylester zusammen mit dem Dihydrohämatinsäure- und Nonandisäureestern im Biotest untersucht. Möglicherweise ist hier eine synergistische Wirkung verschiedener Komponenten als Ursache für die Keimhemmung zu beobachten. Als Cocktail dienten Methylester (1×10^{-4} molare Lösung) aus

- α -Hydroxyisovaleriansäure
- Äpfelsäure
- β -Hydroxy-, β -Methylglutarsäure
- Propantricarbonsäure

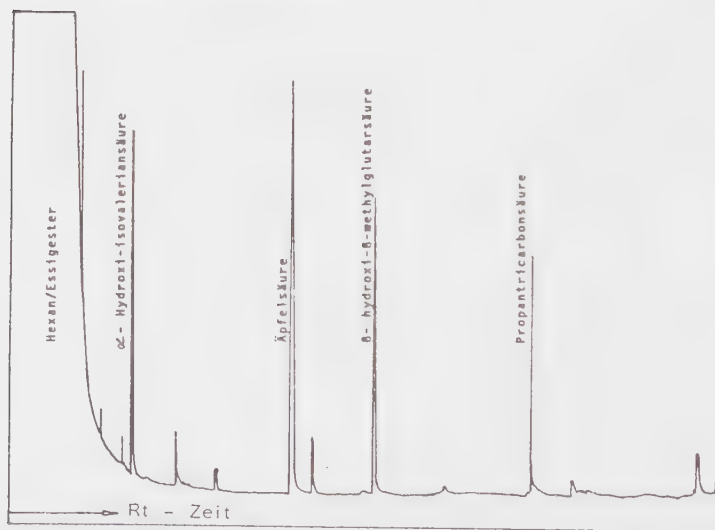


Abb 22 : Kapillargaschromatogramm verschiedener Vergleichssubstanzen (Methylester); GC-Bedingungen wie Abb.9

Dieses Gemisch erwies sich in der verwendeten Konzentration als nicht hemmaktiv. erst bei einer Konzentration, die höher lag als 1×10^{-3} mol/l konnte eine Unterdrückung der Samenkeimung (um 50%) beim Testsaatgut beobachtet werden.

Als nächster Schritt wurde ein Biotest mit der Hemmfraction durchgeführt, bei dem soweit verdünnt wurde, bis die Keimhemmung etwa 50% betrug. Sollte der Coctail eine Verstärkerwirkung ausüben, so mußte hier nach Zumischen eine verstärkte Hemmung auftreten. Als Kontrollwert diente die natürliche Hemmfraction ohne vorausgegangene HPLC Trennung.

Es zeigte sich, daß weder die synthetischen Produkte allein, noch die natürliche Hemmfraction mit Coctail eine gleichstarke Hemmwirkung wie die natürlichen Fractionen hatten. Die synthetischen Dihydrohämatinsäureester und Azelainsäureester bewirkten bei einer $1,7 \times 10^{-5}$ molaren Konzentration eine Herabsetzung der Keimrate um 50%.

12.5. Ablaseversuche

Die bereits früher geäußerte Vermutung (Karl, 1978; Lohaus, 1981), daß es sich bei der nicht erfaßbaren Resthemmaktivität um flüchtige bioaktive Stoffe handeln könnte, wurde durch Ablaseversuche bestätigt. Dabei wurde die Hemmfraction A, der Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20 (vgl. Abb.5) vor Ansatz des Biotests in den Testschälchen einem künstlich angelegten Luftstrom (Stickstoff, 20ml/min für 20 min) ausgesetzt. Es wurde jeweils 50µl und 25µl davon für den Biotest in die Testschälchen pipettiert und der Keimungsunterschied zwischen begasten und unbegasten Fractionen beobachtet. Zur besseren Differenzierung wurde der Test zusätzlich nach 24 Stunden ausgewertet.

Tab.5: Biotest nach Abblasen flüchtiger Hemmstoffe im N_2 -Strom
(Hemmfraktion A, vgl. Abb.5);

Fraktion	Hemmwirkung(%)	
	nach 24h	nach 48h
A(50 μ l)	100	100
A(25 μ l)	100	100
A(50 μ l) begast	75	10
A(25 μ l) begast	50	10

Damit konnte gezeigt werden, daß sich flüchtige Komponenten in der pH-1 Fraktion eines wässrigen Haferspelzenextrakts befinden, die als Keimungshemmstoffe in Frage kommen. Der Aufarbeitungsweg, der zur Identifizierung der Nonandisäure und der Pentantricarbonsäure in der pH-1 Fraktion bei Saathafer geführt hat, war jedoch nicht geeignet, flüchtige Substanzen anzureichern. Besonders die Gefrier-trocknung und die Einengungsvorgänge am Rotavapor, ebenso die Derivatisierung mit Diazomethan, mußten überdacht werden:

Die pH-1 Fraktion enthält hauptsächlich saure Bestandteile; undissoziiert sind diese leichter flüchtig als in Ionenform. Daher wurde das Eluat nach der Sephadexchromatographie zunächst mit Natrium-bicarbonat neutralisiert und erst danach gefriergetrocknet. Bei der Horizontaldestillation wurde das Trägergas nicht ins Freie geleitet, sondern es wurde eine Wasserfalle angeschlossen, um flüchtige, was-serlösliche Bestandteile aufzufangen. Mit der wässrigen Lösung soll-te anschließend ein Biotest durchgeführt werden, um einen möglichen Gehalt an hemmaktiven Stoffen zu erkennen.

Die Analytik der Komponenten erfolgte zunächst über die Gaschro-matographie. Die verwendeten Systeme gingen jedoch von Methyl-estern aus, die verwendeten Glaskapillaren waren nicht für die Auf-trennung freier Säuren geeignet. Es sollte möglich sein, eine wäss-rige Lösung direkt zu untersuchen.

Die Hochdruckflüssigchromatographie brachte bei Anwendung ver-schiedener Techniken keinen Hinweis darauf, daß die hier ange-

sprochenen Trennprobleme gelöst werden könnten (Chrompack News, 1981; Water Ass. 1980; Kazuo, 1980; Böhme, 1984). Moderne Methoden zur Untersuchung saurer Komponenten in wässrigen Lösungen mittels HPLC wurden meist mit Methoden durchgeführt, die eine Wiederverwendung des Eluats nach HPLC Trennung nicht erforderlich machte. Die verwendeten Elutionsmittel, saure Puffer, Ionenpaarreagenzien und organische Lösungsmittel mußten entfernt werden, was immer einen Verlust an biologischem Material nach sich gezogen hätte. Ebenso wenig konnte die Detektion mit dem zur Verfügung stehenden Detektor (UV) erfolgen.

Letztendlich war der Biotest der einzig zuverlässige Detektor für das hier behandelte Problem. Beim Vergleich von Chromatogrammen nach LH-20-Säulenchromatographie der sauren Extrakte von Flughäfer- und Saathäferspelzen wurde festgestellt, daß die Fraktion A bei Flughäferextrakten in höherer Ausbeute vorhanden war. Ebenso ist die keimungshemmende Wirkung bei letztgenannter Matrix höher. An dieser Matrix konnten später auch die bei Saathäfer erzielten Ergebnisse bestätigt werden (vgl. IV B).

B. Flughafener

Die stärker ausgeprägte Hemmwirkung des Flughafers gegenüber Saathafer hatte den Untersuchungen in Teil IV.A zufolge möglicherweise eine Ursache in bislang nicht identifizierten Stoffen aus der Säurefraktion.

1. Wässriger Rohextrakt/pH-1-Fraktion

Wie bereits im Verlauf früherer Untersuchungen an Flughafener festgestellt wurde (Lohaus, 1981), ist die Trennung von Karyopsen und Spelzen bei *Avena fatua* schwierig. Im Vergleich zu *Avena sativa* sind die Karyopsen des Flughafers kleiner und fest umgeben von stark behaarten Spelzen, an deren Enden lange Grannen sitzen (Gewichtsverhältnis Spelze/Karyopse: 1:1). Auf eine Trennung von Karyopsen und Spelze wurde verzichtet. Der wässrige Rohextrakt wurde wie unter IV A 1. gewonnen. Aus 400g Flughafener erhielt man mit 2l dest. Wasser etwa 1850ml wässrigen Rohextrakt. Die Etherextraktionen bei verschiedenen pH-Werten wurden wie unter IV.A.2 beschrieben mit Perforatoren durchgeführt. Grenzflächenaktive Substanzen, die eine Phasentrennung verhindern oder erschweren, reichernten sich dabei nicht in störender Menge an. Für analytische und präparative Aufarbeitung wurde die gleiche Methode gewählt. Man erhielt, wie unter IV. A. 2. beschrieben, die pH-1-Fraktion.

2. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20

Zur Auftrennung der pH-1-Fraktion diente eine Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20-Gel. Die Ergebnisse dieser Trennmethode waren gut reproduzierbar. Die Handhabung des Materials ist einfach und hat sich zu einer Laborstandardmethode entwickelt. Die Abb.22 zeigt das Elutionsdiagramm. Wie daraus ersichtlich, erhielt man durch die Elution mit Wasser 5 ver-

schiedene Fraktionen (Vergl. Elutionsdiagramme u. IV.A.3., Abb. 5 und 6). Da jedoch die Bioaktivität mit den erhaltenen Extinktionswerten nicht korrelierbar ist, mußte nach jeder Säulenchromatographie ein Biotest durchgeführt werden. Die Diagramme dienten somit nur als Orientierungshilfe für die erfolgreiche Auftrennung der Naturstoffextrakte.

Die Teilung der Säure-Fraktion in verschiedene Substanzgruppen ließ sich sensorisch gut verfolgen. Zu Beginn (Fraktion A/B) erhielt man fast farblose Lösungen mit einem zunächst frischen, dann buttersäureähnlichen Geruch, später folgten stärker gelb gefärbte Produkte, mit duftigem, zimtähnlichen Aroma. Auf dem Säulenmaterial blieben braune Komponenten zurück, die erst durch Waschen der Säule mit Methanol, Ether oder Aceton entfernt werden konnten. Die Fraktionen A und B, die quasi ohne Wechselwirkungen mit dem Gel als erstes aufgefangen wurden, waren häufig voneinander nicht zu unterscheiden (Vgl. Ergebnisse unter IV.A.3.). Wie der Biotest zeigte, unterschieden sie sich auch nicht in ihrer keimhemmenden Wirkung. So wurden sie wie in weiter zurückliegenden Versuchen stets zusammengegeben und als eine Fraktion (A) gefriergetrocknet und weiterbehandelt. Da die weiteren Fraktionen auf Inhalt- und Wirkstoffe bereits untersucht worden waren (Loehaus, 1981), hatten sie außer zu Routinebiotests (vgl. IV A 12.) keine Bedeutung und wurden nicht weiter beachtet.

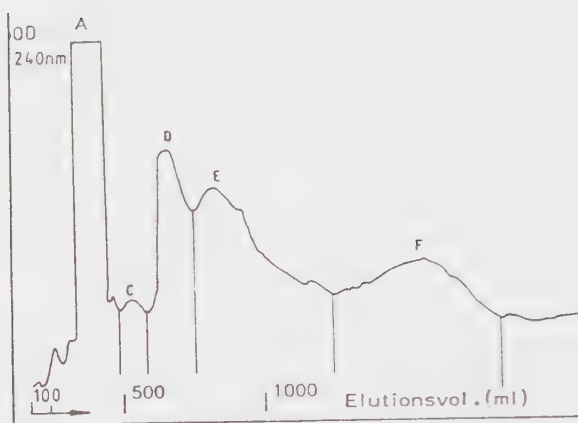


Abb.22 : Säulenchromatographie an Sephadex- LH-20 des pH-1-Extrakts aus Flughaferr, Elution mit H_2O , Det.: UV, 240nm. A ist der hemmaktive Bereich,

3. Gefriertrocknung

Nach Gefriertrocknen der Fraktion A gemäß den unter IV,A geschilderten Bedingungen, erhielt man ein braungelbes, dünnflüssiges Öl von stechendem Geruch, aus welchem sich im Laufe der Zeit eine weiß-gelbe Kristallmasse abschied. Die Fraktion A mehrerer Aufarbeitungen wurde gesammelt und erneut einem Bio-test unterworfen. Die Hemmwirkung im Amaranthuskeimtest lag bei 100% im Vergleich zum Wasserwert.

4. Horizontal-/Kurzwegdestillation

Als Reinigung für die gefriergetrocknete Fraktion A nach Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 wurde die Kurzwegdestillation (III. A. 7.2.) durchgeführt. Der Inhalt der Kühlfalle und des S-

Rohres (Abb.4) wurden vereint und zur Horizontaldestillation verwendet. Mit einer Mikrospritze wurde die Fraktion A in Portionen zu 30µl in die Destillierkapillare eingebracht. Um ein Verschmieren des Materials über einen weiten Bereich zu vermeiden, diente ein kurzes Stückchen einer Pasteurpipettenspitze als "Vorratsgefäß".

(Material u. Meth: III. A. 7.)

4.1. Ablauf der Horizontaldestillation

Die Starttemperatur betrug 110 °C für 10 min. ohne Motorlauf. Dabei wurden Lösungsmittelreste abdestilliert und der größte Teil der flüchtigen Stoffe vom schwer destillierbaren Rückstand schonend entfernt. Anschließend wurde auf ein Gefälle 150/110°C hochgeheizt und der Motorlauf dazugeschaltet. Um den leicht flüchtigen Hemmstoff quantitativ aufzufangen, wurde unter die umgeschmolzene Destillationskapillare ein Dewargefäß gestellt, welches mit Trockeneis/Aceton (-80°C) gefüllt war. Eine Füllung der Kühlvorlage mit flüssigem Stickstoff (-178°C) war nicht sinnvoll, da das Trägergas teilweise mitverflüssigt wurde und nach Herausnehmen der Kapillare aus dem Kältebad zusammen mit dem aufgefangenen Hemmstoff verpuffte.

Nach etwa 2 Stunden war der leicht flüchtige Hemmstoff in die Vorlage gewandert. Man erhielt außerdem noch drei weitere Fraktionen als Ergebnis der Horizontaldestillation; höhere Kondensationsprodukte von dunkelbrauner Farbe blieben am Startpunkt zurück (Tab. 6)

Tab.6: Ergebnis der Horizontaldestillation

Fraktionen	Kondensationsbereich
H1 : weiße Kristallnadeln	150 °C
H2 : gelbe amorphe Flecken	120 °C
H3 : hellgelbes Öl	70 °C
H4 : farblose Flüssigkeit	Kühlvorlage

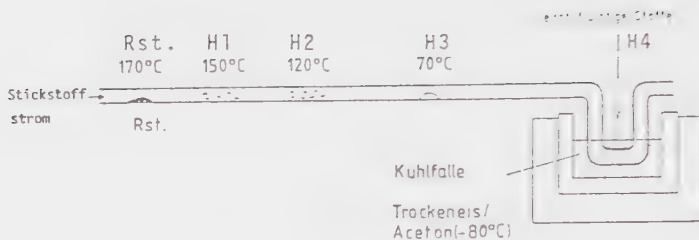


Abb.23 : Destillationskapillare nach Horizontaldestillation der gefriergetrockneten Fraktion A nach Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20;

Die Kapillare wurde aus dem Gerät entfernt und entsprechend den Fraktionen (Tab.6) zerteilt. Von den Fraktionen setzte man einen Biotest an. Hierzu wurden die Kapillaren mit Wasser ausgespült und direkt zum Amaranthuskeimtest verwendet. Tab. 7 zeigt das Ergebnis des Biotests. Demnach befindet sich der Hemmstoff nur in der Fraktion H 4.

Tab.7: Biotest nach Horizontaldestillation

Konzentration zum wässr. Rohextrakt,

Hemmung (%):

Fraktion:	10-fach	1-fach
H1	10	0
H2	0	5
H3	25	5
H4	90	20
gesamt	95	20

Der Biotest zeigt, daß der Hemmstoff in der Fraktion H4 angereichert werden konnten.

4.2. Vorversuche

In Vorversuchen, bei welchen die Kühlfalle durch einen etwa 20 cm langen PVC-Schlauch mit der Kapillare verbunden war, wurde in der Kühlfalle keine Hemmaktivität gefunden; die biologisch aktiven Substanzen wurden vom Kunststoff (PVC) irreversibel adsorbiert. Dies war leicht nachzuprüfen, denn die Schläuche rochen nach Spülen immer noch intensiv nach dem biologischen Material.

Nachdem die Destillierkapillare umgeschmolzen worden war, sodaß sie in einem mit Wasser gefüllten Standgefäß endete, konnte man mittels Biotest die Anwesenheit von Hemmstoffen in dieser wässrigen Lösung nachweisen.

Gleichzeitig ließen sich die Inhaltstoffe über das Gaschromatogramm (nach GC mit gepackter Säule) nachweisen (Abb. 25). So konnte zum ersten Mal die schon an anderer Stelle geäußerte Vermutung (vgl. IV A), daß leicht flüchtige Bestandteile zur keimungsinhibitorischen Wirkung beitragen, bestätigt werden. Zur weiteren Präparation wurde die Horizontaldestillation vereinfacht.

Dabei wurde auf die Trennung der ersten drei Fraktionen verzichtet; die Destillation konnte nach Erscheinen des farblosen Tropfens in etwa der Mitte der Destillationskapillare gestoppt werden. Um den so aufgefangenen leichtflüchtigen Hemmstoff zu konservieren bzw. transportfähig zu machen, wurden die Enden der Kapillare zugeschmolzen.

5. Gaschromatographie

Bei der Auswahl der weiteren Analytik mußten die Ergebnisse der Horizontaldestillation berücksichtigt werden.

Die Derivatisierung der über Sephadex-LH-20- Säulenchromatographie angereicherten Hemmfraction in Methylester erschien nicht länger sinnvoll: Zum einen wurde die Flüchtigkeit der Komponenten weiter erhöht, zum anderen entstehen bei der Derivatisierung mit Diazomethan stets Nebenprodukte, die einen weiteren Reini-

gungsschritt notwendig machen, was wiederum Substanzverlust bedeutete. Vergleich man die Gaschromatogramme der hemmaktiven Fraktion nach Derivatisierung so zeigte sich, daß abgesehen von Lösungsmittelpeak (Hexan/ Essigsäureethylester) und Verunreinigungen, die vom Diazomethan herrührten, keine weiteren Substanzen identifiziert werden konnten. (Dieses Ergebnis betraf Untersuchungen, die mit Kapillarsäulen/Splitttechnik durchgeführt wurden).

Die Frage war, ob es nicht mit gepackten Säulen möglich sei, dieses Gemisch aufzutrennen. Hierzu stand eine Methode zur Verfügung stand, wässrige Lösungen direkt zu analysieren (Ranfft, 1970). Nachdem ein System für kleinere Moleküle an unseren Geräten erarbeitet worden war, bei dem sowohl Lösungsmittel als auch niedere Fettsäuren aufgetrennt werden konnten, wurden Versuche durchgeführt, um Hemmaktivität mit Gaschromatogrammen zu korrelieren.

Um die Trennleistung für leicht flüchtige Säuren auf verschiedenen Säulen zu überprüfen, war es notwendig, mit einem Standardgemisch zu arbeiten. Zu diesem Zweck wurden 0,1% ige Lösungen verschiedener organischer Säuren bzw. Lösungsmittel gemischt und gaschromatographisch untersucht (Abb.24). Diese Komponenten konnten reproduzierbar aufgetrennt werden. Gleichzeitig diente das Gemisch dazu, die Trennleistung des gaschromatographischen Systems regelmäßig zu überprüfen. Nun konnte das wässrige Eluat der nach Sephadexchromatographie aufgetrennten pH-1-Fraktion mittels Gaschromatographie untersucht werden. Dazu wurde analog zum Biotestverfahren von jeder 10. Fraktion ein Aliquot über die gepackte Säule chromatographiert. Über die Peakfläche ließ sich auch eine quantitative Aussage über die einzelnen Bestandteile machen (vgl. Abb. 25).

Standardchromatogramm für CHROMOSORB 101

Inj.Temp.: 125°

Prgm.: 60-190°

15°/min.

- 1) Methanol
- 2) Ethanol
- 3) Aceton
- 4) Essigsäure
- 5) Propionsäure
- 6) Buttersäure
- 7) Valeriansäure
- 8) Capronsäure
- 9) Heptansäure
- 10) Octansäure

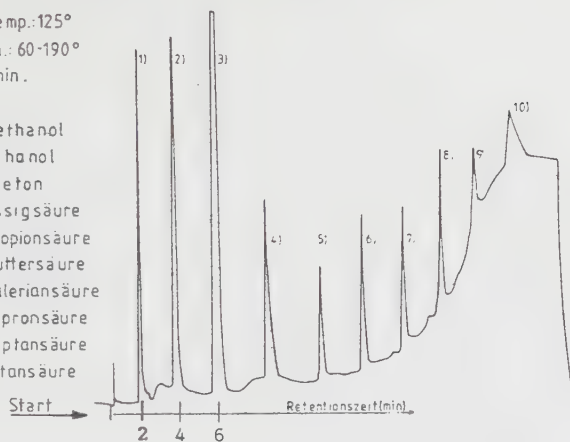


Abb. 24 : Gaschromatogramm von Standardsubstanzen an gepackter Glassäule (Chromosorb 101; Säule: 2mx3mm; weitere Bed.vgl. III B 2.)

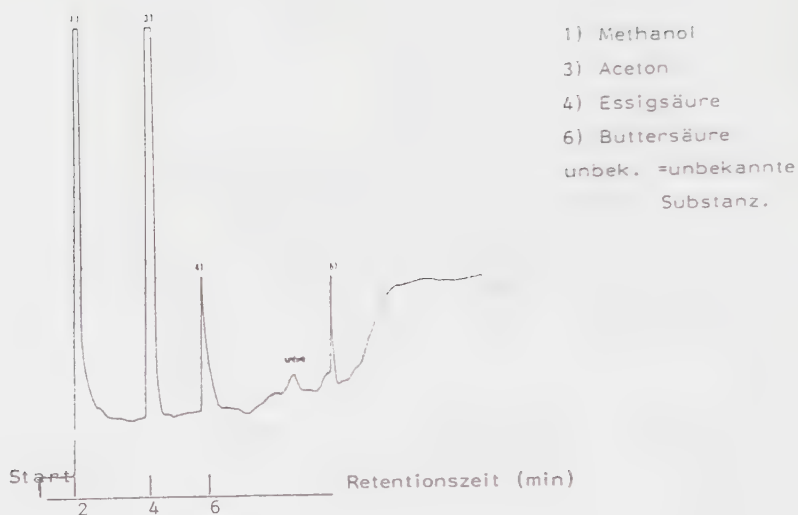


Abb.25 : Gaschromatogramm der Hemmfraction A eines Flughäfer-pH-1-Extrakts nach Chromatographie an Sephadex-LH-20; das Eluat wurde direkt untersucht (Einspritzmenge 1 μ l, weitere Bed. und Nummerierung der Peaks wie Abb.24)

Für die Untersuchung auf hemmaktive Komponenten der pH-1-Fraktion wurde die Fraktion A nach Sephadexchromatographie (entsprechend dem Biotest) gaschromatographisch untersucht. Man erhielt so einen Überblick über die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Hemmfraction A. Alle hemmenden Fraktionen zeigten einen Peak, der zwischen Essigsäure und Buttersäure liegt (Abb.25 u. 26). Bei der Gaschromatographie der hemmaktiven Fraktion nach Horizontaldestillation zeigte sich die gleiche

Substanz wieder. Es war anzunehmen, daß es sich um eine biologisch aktive Komponente handeln konnte. Durch Vergleich mit Standardlösungen einer bekannten Konzentration, konnte man mit einem Biotest eine vorgetäuschte Hemmwirkung, die nur durch eine hohe Konzentration der Inhaltstoffe hervorgerufen wird, ausschließen. Es wurden auch Vergleiche durchgeführt, bei denen die nach Horizontaldestillation gewonnene Fraktion H4 nicht in Wasser, sondern in Hexan/Essigsäureethylester (50:50) gelöst war (Abb.27). Man erkennt, daß die hemmende Komponente eine kürzere Retentionszeit hat als Essigsäureethylester. Damit ist erklärt, warum bei der kapillargaschromatographischen Untersuchung nur der Lösungsmittelpeak identifiziert werden konnte. Weiter macht es begreiflich, daß bei Begasen der in Hexan-Essigester (50:50) gelösten Hemmfraktion ein Teil der Hemmaktivität verschwand. Aus dieser Erfahrung ergaben sich neue Bedingungen für die GC/ MS-Analyse. Mit dieser Technik sollten Aussagen über die chemische Strukturen der unbekannten Komponenten erhalten werden.

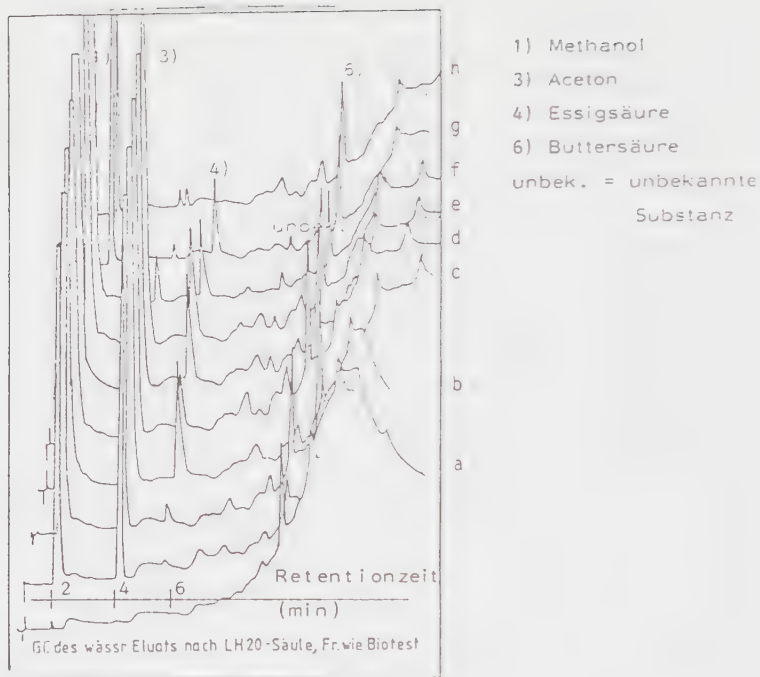


Abb.26 : Dreidimensionale Darstellung hemmaktiver Fraktionen (a-h) nach LH-20-Chromatographie; (Bed. vgl. Abb.24)

Die in Fraktion H4 enthaltenen Substanzen wurden zunächst in verschiedene Lösungsmittel aufgenommen und gaschromatographisch untersucht (Hexan/Essigester; Wasser; Ether). Als GC- Systeme wurde die Kapillargaschromatographie und die GC über gepackte Säule verwendet.

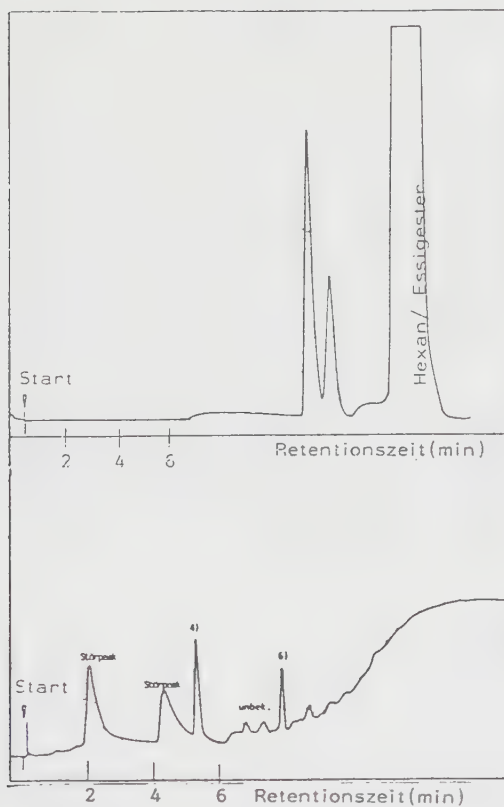


Abb.27 : Gaschromatogramm der Hemmfraktion (H4) nach Horizontaldestillation aufgenommen in Hexan/Essigsäureethylester, 1:100 mit Wasser verdünnt.

Abb.28 : Gaschromatogramm der Hemmfraktion H4, aufgenommen in Wasser, (Bed.vgl. Abb. 24.)

6. Massenspektrometrische Untersuchung

Die durch Horizontaldestillation isolierte Fraktion H4 wurde über die Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) untersucht. (vgl. III B 4.1). Durch den Betrieb des GC/MS- Systems bei niedrigen Temperaturen (50°C, isotherm), gelang eine gaschromatographische Trennung aller leicht flüchtigen Komponenten mit anschließender massenspektrometrischen Analyse am Kapillarsäulensystem; das Auftreten von Überlagerungsspektren aufgrund schlechter gaschromatographischer Trennung war sehr gering.

Die Identifizierung der Substanzen und die Interpretation der Massenspektren wurde durch die bei der Gaschromatographie erzielten Ergebnisse erleichtert. (GC-Untersuchungen von Vergleichslösungen wiesen bereits auf das Vorhandensein von Essigsäure und n- Buttersäure hin).

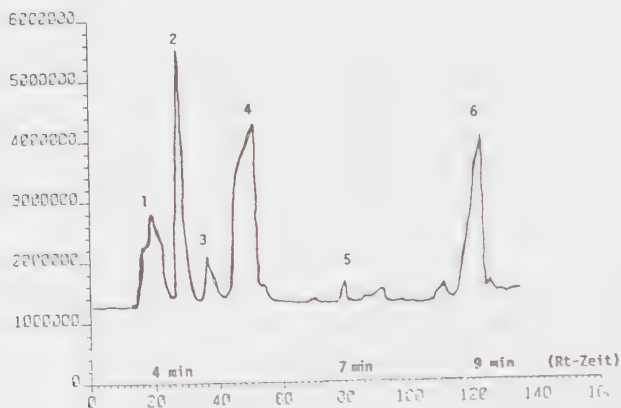


Abb.29 : Gaschromatogramm der Fraktion H4 im GC/MS-System
(Bed. wie III B 4.1)

Substanzen:

- | | |
|------------------|--------------------------------|
| 1. Diethylether; | 2. Essigsäuremethyl/ethylester |
| 3. Ethanol | 4. Essigsäure |
| 5. X(unbekannt) | 6. Buttersäure |

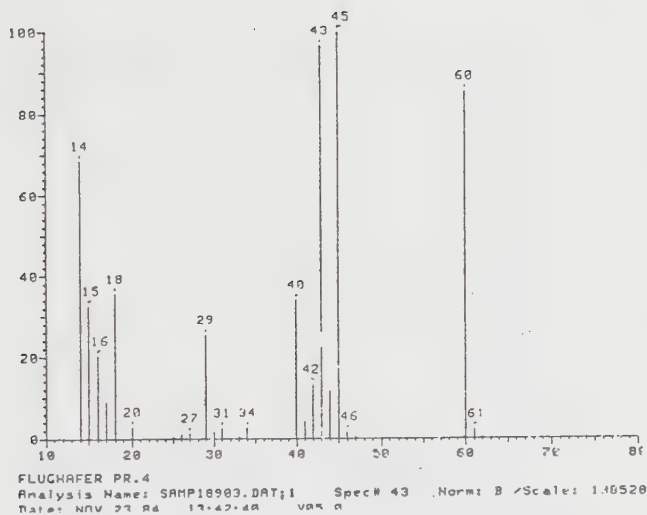


Abb.30 : 70 eV- Massenspektrum der Substanz 4, Abb.29; (Essig-
säure).

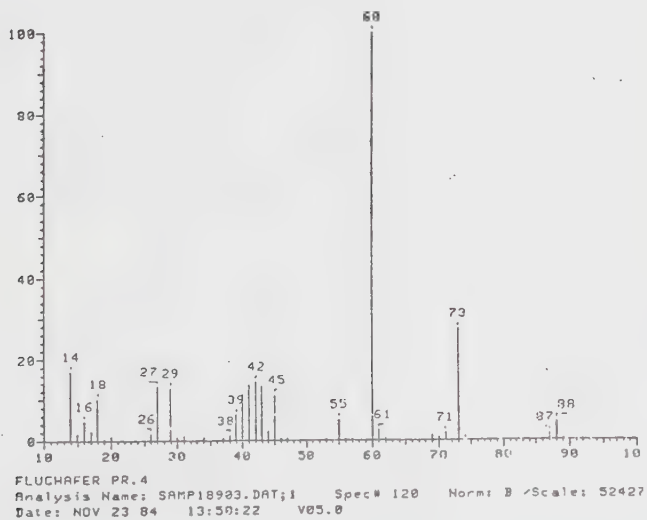


Abb.31 : 70 eV- Massenspektrum der Substanz 6, Abb.29; (Butter-
säure).

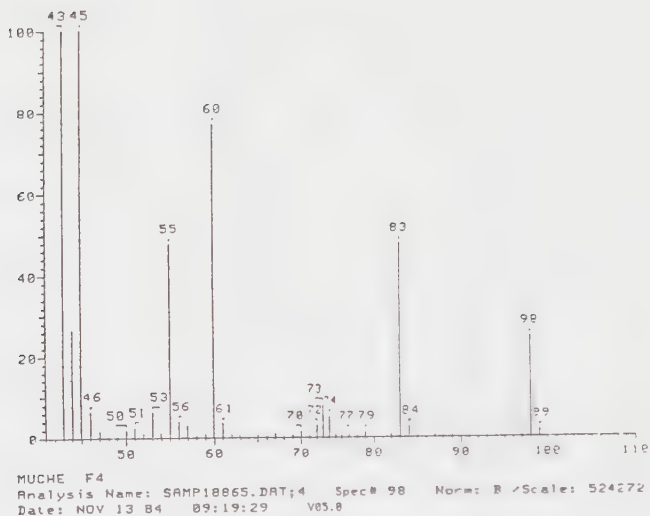
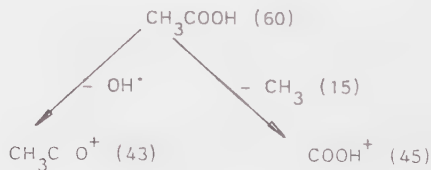


Abb.32 : 70 eV- Massenspektren der unbekannten Substanz 5,
 Abb.29

Die Massenspektren wurden wie folgt interpretiert:

Substanz 4 wurde als Essigsäure identifiziert. Das Molekölion bei $m/z=60$ spaltet eine Hydroxylgruppe (17 ME) zum intensiven Acetylion bei $m/z=43$ ab; der Verlust der Methylgruppe liefert das Ion bei $m/z=45$.

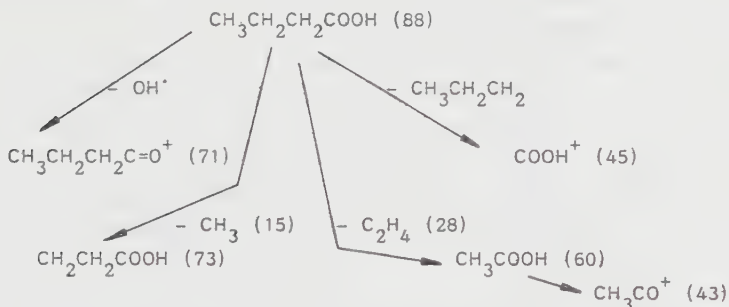
Tab.8: Zerfallschema für Essigsäure



In analoger Weise ist der Zerfall von Substanz 6 (Abb.31) zu verstehen, die als n-Buttersäure identifiziert wird. Wieder ist der Verlust von 15 Masseneinheiten (α -spaltung) der

erste Schritt. Er führt zu einem Bruchstück bei $m/z=73$. Der Verlust von Ethylen erklärt die Bildung des Ions $m/z=60$; dieses Bruchstück bildet wieder ein Ion $m/z=43$.

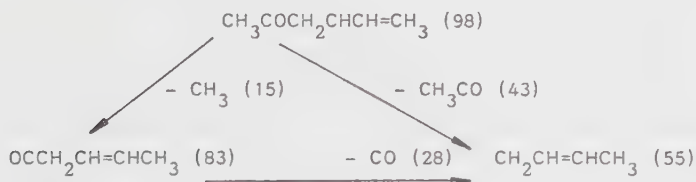
Tab.9: Zerfallschema für Buttersäure



Für die unbekannte Substanz X (Abb.32) kann die Struktur eines n-Hexen-2-ons diskutiert werden.

Aus dem Moleküllion bei $m/z=98$ und den intensiven Fragmenten bei m/z 43, 55, und 83 kann auf die Elementarzusammensetzung von $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$ geschlossen werden.

Tab.10: Zerfallschema für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$

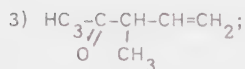
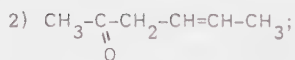
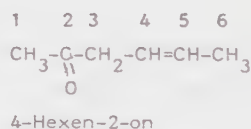
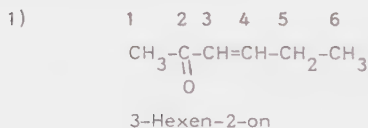


Die Struktur des ungesättigten Methylketons erklärt den Verlust der Methylgruppe ($m/z 98 - 83$) durch α -Spaltung. Die gleiche Spaltung auf der anderen Seite der Carbonylgruppe führt einerseits zum intensiven Ion bei m/z 43, andererseits wird durch die Doppelbindung die Lokalisierung der Ladung auf den Kohlenwasserstoffteil des Moleküls verständlich und die hohe Intensität des Ions bei m/z 55 erklärt. Diese Interpretation des Massenspektrums kann wegen der

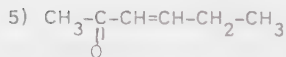
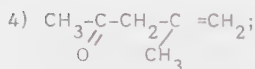
möglichen schnellen Umlagerung des Allylkations (m/z 57) und der Mesomerieverhältnisse weder die Lage der Doppelbindung noch die unverzweigte C-Kette beweisen. Die im Spektrum vorhandenen Ionen bei m/z 60 und 45 sind zweifellos auf Verunreinigungen an Essigsäure zurückzuführen. Diese wird als sehr polare Substanz auf der Gaschromatographiesäule verschleppt und erscheint im Untergrund des Chromatogramms.

Mit verschiedenen Versuchen wurden die vermuteten Strukturelemente, Carbonylfunktion und C=C-Doppelbindung, bestätigt. Nach Methylierung mit Diazomethan blieb das Molekülion bei m/z 98 erhalten. In wässriger Lösung wurde Bromwasser und Kaliumpermanganatlösung entfärbt. Über die Position der Doppelbindung kann nur aufgrund des chemischen Verhaltens, insbesondere die Acidität (die Anreicherung erfolgte in der sauren Fraktion der Aufarbeitung) angenommen werden, daß sie sich in α -Stellung zur Carbonylfunktion befinden muß. Die Vermutung, es handle sich um ein Methylketon, wird in beiden möglichen Zerfallwegen bestätigt.

Strukturvorschläge:



von allen Strukturen sind zwei
Isomere möglich



Tab.11: verschiedene Massenspektren mit $m = 98$:

(Auswahl aus Mass spektra Data;)

<u>m/z- Werte:</u>	<u>rel. Intensität:</u>	<u>Name:</u>
98 83 79 55 53 43	12 30 17 39 17 100	3,5-Hexadien-2-ol; 3280-51-1, Q9181
98 83 55 54 53 43	45 35 31 22 10 100	4-Hexen-2-on; 25659-22-7, S1146
98 55 43	13 13 100	4-Hexen-2-on; 25659-22-7, S1147
98 55 53 43	8 12 3 100	3-Methyl-4-penten-2-on; C1190
98 83 55 43	16 18 20 100	3-Methyl-4-penten-2-on; 374402-3, Q9766
98 83 43	5 4 100	4-Methyl-4-penten-2-on; O1774
98 83 55 43	5 4 19 100	5-Hexen-2-on; 109-49-9, P8255
98 83 55 43	32 48 46 100	unbek. Subst. (3-Hexen-2-on ?)

Bei der in Tabelle 11 wiedergegebenen Auswahl wurden Spektren berücksichtigt, bei denen das Bruchstück $m/z = 43$ der 100% Peak war; die Werte $m/z = 83$ und $m/z = 55$ sollten ebenfalls deutlich meßbar sein, ebenso der Molekülpeak $m/z = 98$. Man erkennt, daß gleiche Molekülstrukturen doch unterschiedliche Meßintensitäten ergeben. Ein Vergleichspektrum für die vorgeschlagene Struktur: 3-Hexen-2-on konnte nicht gefunden werden.

7. Biotest mit den identifizierten Komponenten

Von den identifizierten Komponenten der leichtflüchtigen Fraktion H4, wurden synthetische Substanzen gemischt und ihre Bioaktivität mit der natürlichen Hemmfraction verglichen. Zusätzlich wurden zwei andere Carbonylverbindungen (n-Hexenal und n-Heptanon) im Biotest eingesetzt. Als "aut simile" für die unbekannte Substanz wurde Hexanon zu Essigsäure und Buttersäure gemischt. Bei der Berechnung der natürlichen Hemmfraction diente Essigsäure als Bezugskomponente zur Ermittlung der Konzentration. Das Ergebnis ist in Abb. 33 dargestellt.

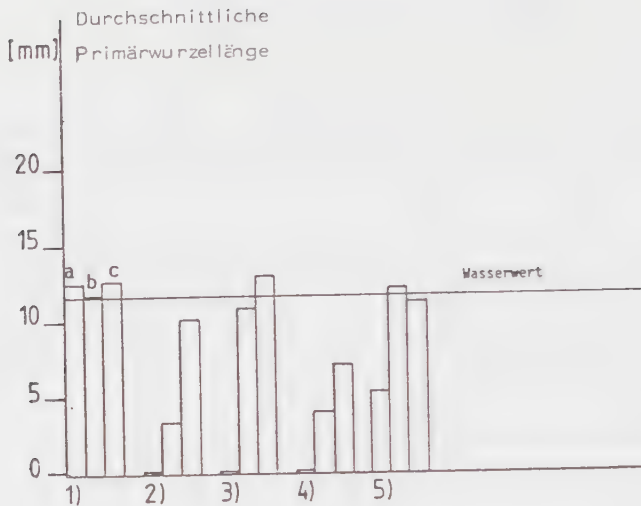


Abb.33 : Ergebnis des Biotests mit synthetischen Komponenten (Amaranthuskeimtest mit 25 Samen/Schälchen; durchschnittliche Keimwurzellänge)

Konzentrationen je: a) 1×10^{-3} , b) 10^{-4} , c) 10^{-5} -molar.

1) n-Heptanon

2) Essig-/Buttersäure 1:1

3) Hexenal

4) Hexanon, Essig-, Buttersäure.

5) Hemmfraction H 4 (Angabe der Konz. nur für Essigsäure)

Abbildung 33 zeigt, daß ein Gemisch der identifizierten Komponenten die Entwicklung des Amaranthuskeimlings hemmt. Bei der Hemmfraction H 4 ist die inhibitorische Wirkung nicht so stark ausgeprägt, da die Konzentration von Hexanon und Buttersäure in einem anderen Verhältnis zu Essigsäure stand. Bezogen auf das Volumen des wässrigen Rohextrakts, verursachte die Fraktion H4 in 1,25-facher Konzentration Totalhemmung beim Keimtest.

9. Flüchtige Bestandteile in Pflanzenextrakten und ihre Bedeutung als Inhibitoren

Bisher wurde das hier identifizierte Gemisch leicht flüchtiger Substanzen noch nicht mit der inhibitorischen Wirkung von Flughafereextrakt in Verbindung gebracht.

Die Untersuchung von flüchtigen Verbindungen in Zusammenhang mit physiologischer Wirksamkeit wurde jedoch an anderem Pflanzenmaterial untersucht. Guedner(1985) beschreibt hier die inhibitorische Wirkung von verschiedenen Aldehyden, Ketonen und Alkoholen auf *Aspergillus flavus*. Genannt wurden trans-2-Hexenal, 2,4-Hexadienal, Furfurol, β -Ionon und 1-Nonanol. Die Wirksamkeit war dabei von Aldehyden zu Alkoholen hin abnehmend. Heisey (1984) identifizierte den Monoterpenalkohol "Terpin-4-ol" als phytotoxischen Bestandteil in *Trichostema canescens*, einem Lippenblütler des kalifornischen Graslandes. Auch ist der Gehalt an Aldehyden und Ketonen in der "Säurefraktion" beschrieben (Mick,1984). Vergleichbare Strukturen, wie das hier vermutete Hexenal, sind dabei identifiziert worden. Sie decken fast alle formulierbaren Strukturen von C_5 - C_8 - Aldehyden und Ketonen ab (Kazeniak, 1970; Gonzales, 1972; Yaham, 1984; Jüttner, 1983; Gill, 1984; Shimizu, 1982). Physiologische Wirksamkeit ist in der hier dargestellten Weise jedoch noch nicht beschrieben worden. Eine länger zurückliegende Arbeit (Randolph, 1960) schreibt dem -Hexenal eine fungizide Wirkung zu, die der untersuchten Pflanzenspezies, *Ginkgo biloba*, zu erhöhter Widerstandsfähigkeit verhilft. Mit neuer GC-Technik (Headspace GC mit Tenax Trapping) könnten sicherlich weitere flüchtige Spurenbestandteile identifiziert werden. Dieses System stand im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht zur Verfügung. Tsugita, (1979) konnte mit dieser Technik kurze Carbonsäuren (C_2 - C_8) neben Carbonylverbindungen gleicher Kettenlänge nachweisen.

10. Direkte qualitative und quantitative Bestimmung von flüchtigen Bestandteilen in Weinessig

Als Beispiel für die Übertragbarkeit der hier beschriebenen Versuche sei hier kurz beschrieben, wie mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erarbeiteten GC-Versuche eine für Routinezwecke brauchbare Methode entstand. Bei der lebensmittelchemischen Beurteilung von Weinessig erfolgt eine Bestimmung der unerwünschten Gärungsnebenprodukte Acetaldehyd und Aceton, sowie die Bestimmung von Restäthanol und der gebildeten Essigsäure. Diese Untersuchungen können mit dem gleichen gaschromatographischen System wie unter IV B beschrieben durchgeführt werden. Zur Eichung wurde ein externes Standardgemisch hergestellt und mit dem 1:100 verdünnten Weinessig verglichen. Das Ergebnis zeigt Abb. 34:

Eichgemisch



Untersuchungsprobe (Weinessig)



Abb. 34: Gaschromatographische Untersuchung von Weinessig über Chromosorb 101. (Weitere GC-Bedingungen s. III B 2).

C. Hagebutten (Rosa)

Hagebutten (Rosa) zeigen wie Hafer und Flughafer eine starke Keimruhe. Der wässrige Extrakt von Hagebutten zeigte hier im Amaranthuskeimtest starke Hemmwirkung. Also lag der Gedanke nahe, ob es möglich sei, wie bei den in den vorhergegangenen Kapiteln beschriebenen Naturstoffen, über die Heißwasserextraktion verschiedene Hemmfraktionen zu erhalten und neue Hemmstoffe zu beschreiben.

1. Rohextrakt

Zur Gewinnung des wässr. Rohextrakts wurden ganze Früchte verwendet. Diese wurden nach der Ernte zunächst in Portionen tiefgefroren und vor der Extraktion grob zerkleinert (vgl. dazu III A 3.). Das Zerkleinern erfolgte im noch gefrorenen Zustand. Wurden die Früchte bei Raumtemperatur zerkleinert, erhielt man einen Brei, der ein gleichmäßiges Umfließen des Extraktionswassers in der Soxhlet-Apparatur verhinderte. Die Füllmenge für einen Ansatz betrug 500g Hagebutten und ergab mit 2.500 ml Wasser im Durchschnitt 2.400ml wässrigen Rohextrakt.

2. Extraktion bei verschiedenen pH-Werten

Ersten Aufschluß über die chemische Natur der Hemmstoffe gab die Einteilung in die Extraktionsfähigkeit bei verschiedenen pH Werten mittels Diethylether.

2.1. Extraktion bei pH-7

Zunächst wurde eine Neutralfraktion abgetrennt. Wie unter Kapitel IV. A und B beschrieben, wurde dazu der wässrige Rohextrakt mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung auf pH-7 gebracht und im Perforator mit frisch destilliertem Diethylether über 48

Stunden extrahiert. Nach erfolgter Extraktion wurde das Lösungsmittel entfernt und ein aliquoter Teil für den Amaranthuskeimtest mit bidest. Wasser versetzt, sodaß man Lösungen erhielt, die eine 10- bis 1,25-fache Konzentration zum Volumen des wässrigen Rohextrakt darstellten.

Tab.12: Ergebnis des Biotests mit dem Etherextrakt der Neutralfraktion aus einem wässrigen Hagebuttenextrakt, 25 Samen/ Testschälchen
Konzentration, bezogen auf den

wässr. Rohextrakt	Hemmwirkung (%)
10,0-fach	100
5,0-fach	100
2,5-fach	100
1,25-fach	55

2.2. NH_3 -Verseifung

Um zu prüfen, ob es sich bei den hemmaktiven Substanzen der Neutralfraktion um chemisch gebundene saure oder um Neutralstoffe handelte, wurde eine Hälfte der Neutralfraktion alkalisch verseift. Dazu wurde nach Extraktion bei PH-7 die verbliebene wässrige Lösung auf pH-1 eingestellt, mit Diethylether ausgeschüttelt, die hier verbliebene wässrige Lösung wurde mit NH_3 alkalisch verseift. Nach Wiederholung der Extraktionen bei verschiedenen pH- Werten wurde von der verseiften pH-1-Fraktion ein Biotest angesetzt. Dabei wurde wiederum die 10- bis 1,25-fache Konzentration zum wässrigen Rohextrakt hergestellt.

Tab.13: Ergebnis des Biotests mit einem wässrigen Hagebutten-extrakt (NH_3 -verseifte Fraktion)

Konzentration bezogen auf den wässr. Rohextrakt	Hemmwirkung (%)
10,0-fach	100
5,0-fach	100
2,5-fach	75
1,25-fach	60
Rückstand	0

Aus dem Ergebnis dieses Biotests läßt sich schließen, daß gebundene Hemmstoffe sauren Charakters in Hagebutten vorliegen. Nach Tillberg (1983) ist die Hemmwirkung auf den Gehalt an Abscisinsäure zurückzuführen.

2.3 Extraktion bei pH-1

Von der wässrigen Lösung, die nach Etherextraktion bei pH-7 zurückgeblieben war, wurde ein pH-1-Extrakt hergestellt (vgl. III A 4.2.). Der anschließende Hemmtest mit dem Etherextrakt zeigte, daß die Säurefraktion ebenfalls Hemmstoffe enthält. Die 1,25-fache Konzentration zum wässrigen Rohextrakt zeigte auch hier noch Totalhemmung im Amaranthuskeimtest. Eine Tabelle wie Tab. 13 ließe sich hier darstellen.

3. Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20

Zur weiteren Reinigung diente die bereits unter IV.A.u.B. durchgeführte Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20-Gel. Als Detektor zum Auffinden biologisch aktiver Fraktionen wurde ein Hemmtest angesetzt. Bei der Auswertung dieses Keimtests wurde einmal

die absolute Keimrate ausgewertet, zum anderen die durchschnittliche Primärwurzellänge ermittelt. Hierbei ließ sich zeigen, daß die einfache Bestimmung der absoluten Keimrate ausreicht, um Hemmfractionen einzugrenzen (Abb.35).

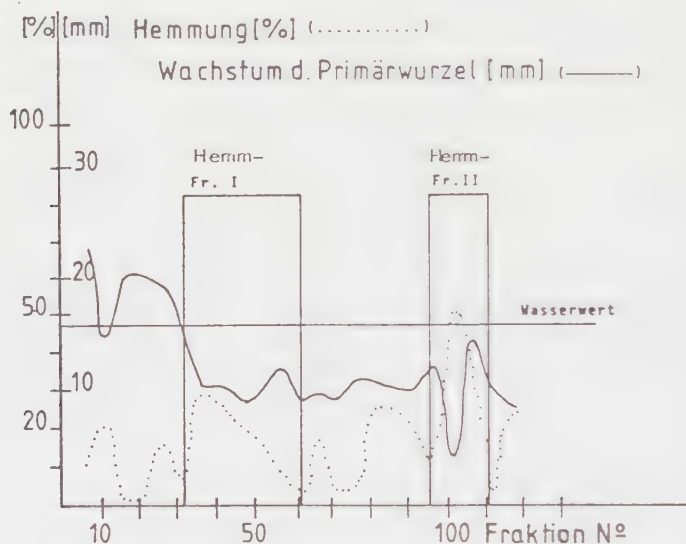


Abb.35 : Verlauf der Hemmaktivität während der Chromatographie einer Säurefraktion aus Hagebutten an Sephadex-LH-20; (Die Fraktionen I u. II wurden getrennt untersucht.

4. Untersuchung der Fraktion I nach Sephadexchromatographie

4.1 Derivatisierung der Fraktion I

Die hemmaktiven Fraktionen I und II wurden gefriergetrocknet (vgl. III A 6.) und zur weiteren Bearbeitung methyliert. Bei der Derivatisierung mit Diazomethan der Fraktion I konnte man beobachten, wie sich schon während der Zugabe der etherischen Reaktionslösung ein großvolumiger Niederschlag aus gelb-weißen Kristallnadeln bildete.

4.2. Horizontaldestillation der Fraktion I

Als nächster Schritt zur Identifizierung eines möglicherweise neuen Hemmstoffs aus der pH-1-Fraktion von Hagebutten, diente die Horizontaldestillation (Abb. 3) der methylierten Fraktion I.

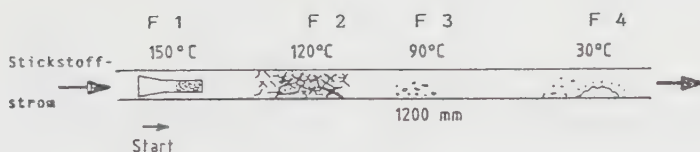


Abb.36 : Ergebnis der Horizontaldestillation der methylierten Fr.I (nach Chromatographie an Sephadex-LH-20) der Säurefraktion aus Rosa.

Destillationsbedingungen:

Anfangstemperatur: 150 °C, 0,5h; danach Rückgang auf: 100/70 °C, 0,5h; dann Ausschalten des Gradientenofens und Destillation bei Raumtemperatur.

Von den durch Horizontaldestillation erhaltenen Fraktionen (vgl. Abb. 36) mußte wieder ein Biotest durchgeführt werden. Die Destillationskapillare wurde wie unter IV.A. beschrieben weiter behandelt. Die Bestandteile der einzelnen Fraktionen wurden mit Hexan/Essigsäureethylester (50:50) herausgelöst. Diese Eluate wurden eingengt, erneut in Hexan/Essigsäureethylester (50:50) aufgenommen, diesmal in einem definierten Volumen (500µl). Für den Biotest wurden einmal 50µl, einmal 20µl eingesetzt. Zur Entfernung des Lösungsmittels auf dem Filterpapier der Testschälchen ließ man einen Stickstoffstrom darüber streichen.

Tab. 14: Ergebnis des Biotests nach Horizontaldestillation der methylierten Fraktion I aus Rosa (Abb.36); Hemmwirkung (%).

eingesetzte

Menge	gesamt	30°C F4	90°C F3	F 2	Rst. F1
50µl	100	5	65	100	75
20µl	100	10	20	25	40

Hemmaktive Substanzen befinden sich demnach in Fraktion F2 und in der Fraktion F3.

5. Gaschromatographie

Die weitere Untersuchung der in Hexan/Essigsäureethylester (50:50) gelösten Fraktionen erfolgte über die Gaschromatographie. Diese Untersuchung zeigte (Vergleich der Retentionszeiten mit bekannten Substanzen, Zuspitzmethode), daß die Fraktion 2 (Kristallnadeln) aus Citronensäuretrimethylester bestand. Die Hemmwirkung war allein auf die hohe Konzentration dieses Stoffes zurückzuführen (vgl. IV B 5.). Nach Verdünnen der Lösung auf einen Gehalt von $0,5 \times 10^{-3}$ mol/l Citronensäuretrimylester war keine Hemmwirkung mehr vorhanden.

Die 90°C-Fraktion stellte noch immer das komplexe Gemisch einer Vielzahl saurer Verbindungen dar (Abb. 37). Untersuchungen an diesem Gemisch wurden von Lohaus (1985) durchgeführt. Dabei wurde ein bisher nicht bekanntes Pyron als inhibitorisch aktiv isoliert und identifiziert.

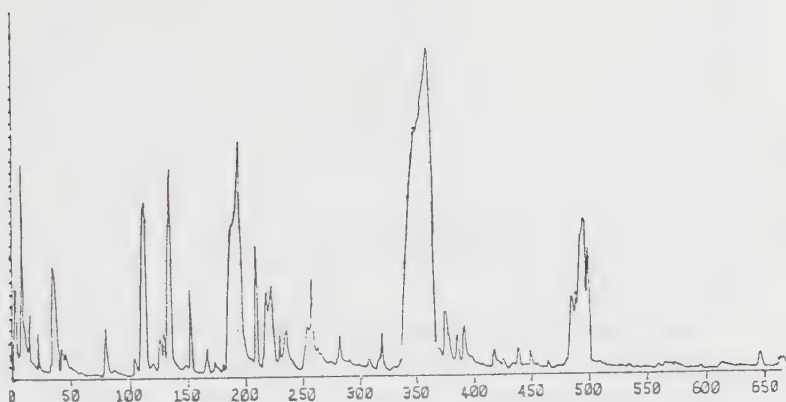


Abb.37: GC-Analyse eines angereicherten sauren Etherextrakts aus *Rosa canina*; (Lohaus, 1985)

6. Untersuchung der methylierten Fraktion II

Die Säurefraktion aus einem wässrigen Hagebuttenextrakt enthält zwei Hemmfractionen (Abb.35), die jede für sich untersucht wurden. Gemäß den Erfahrungen, die bereits mit der Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20 gemacht worden waren (Lohaus, 1981), sollten höhermolekulare, saure Verbindungen unter hier angelegten Bedingungen im Bereich der Fraktion II zu finden sein. Möglicherweise war hier die bereits beschriebene Abscisinsäure ebenfalls aufzufinden.

6.1. Säulenchromatographie an LichroPrep-Si-60

Zur Reinigung der Fraktion II diente eine Säulenchromatographie an LichroPrep-Si-60 mit Hexan und Essigsäureethylester als Elutionsmittel (vgl. III A 9.). Das Eluat dieser Säulenchromatographie wurde in Portionen zu 2ml aufgefangen. Von jeder Fraktion wurde ein Hemmtest durchgeführt. Bei Fraktion 45 (45 $\hat{=}$ 45% Essigsäureethylester in Hexan), zeigte der Biotest

Totalhemmung. Das Eluat wurde gaschromatographisch untersucht. Das Kapillargaschromatogramm (vgl. III A 5.) zeigt einen Peak bei 192 °C. Durch Vergleich mit dem synthetischen Produkt wurde Abscisinsäure identifiziert (Abb.38). Für die Verdünnung der Hemmstofflösung diente der genau eingewogene Standard als Berechnungsgrundlage für den Abscisinsäuregehalt im Biotest.

6.2. Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure

Die quantitative Bestimmung von Abscisinsäure wurde mittels Hochdruckflüssigchromatographie durchgeführt (vgl. III A 8.). Der Gehalt wurde durch Integration über die Peakflächen ermittelt, da das Chromatogramm der HPLC neben dem Lösungsmittelpeak keinerlei andere Peaks in der Nähe zeigte. Als Vergleich diente eine frisch hergestellte Standardlösung von Abscisinsäure. Ausgangsmaterial war ein Aliquot der nach Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20 erhaltenen Fraktion II (Abb. 35), gelöst Aceton. Die Retentionszeit der Abscisinsäure am verwendeten System betrug 16'54''. Als Durchschnittswert bei den verschiedenen Aufarbeitungen ergab sich ein Gehalt von 5µg Abscisinsäure, pro 1g Hagebutten. Etwa gleichzeitig zu den hier beschriebenen Versuchen erschien eine Veröffentlichung von Tillberg (1983) zu diesem Thema. Die dort durchgeführten quantitativen Bestimmungen wurden unabhängig voneinander auf sehr ähnliche Weise durchgeführt. Die Elution mit einem sauren Puffer trug hier wesentlich zur guten hochdruckflüssigchromatographischen Trennung bei.

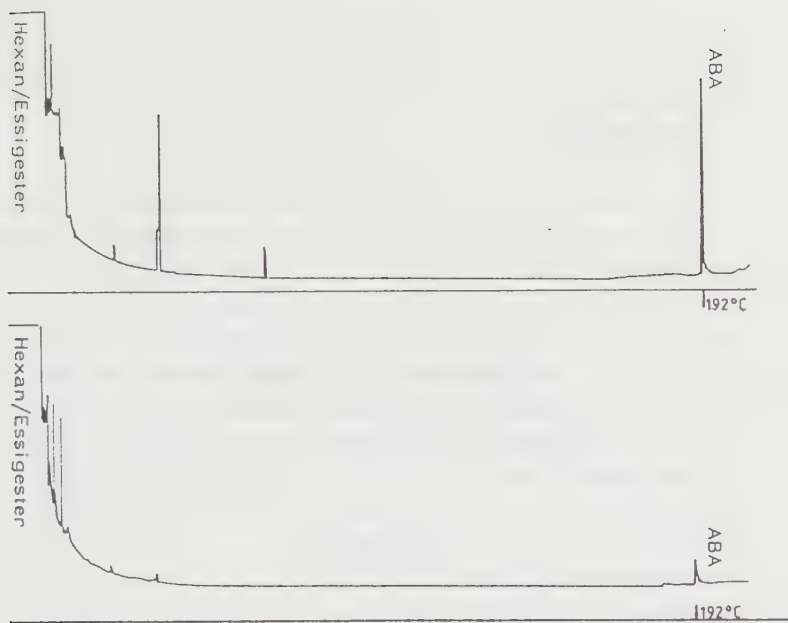


Abb. 38: Kapillargaschromatogramm von Abscisinsäuremethylester,
 Säule: OV 101,25m; Prgm:60 -240°C; 3°/min.
 oben: authentische Abscisinsäure
 unten: Hemmfraktion II(45) aus Hagebutten

6.3. Vergleich der Bioaktivität von Fraktion II mit authentischer Abscisinsäure

Nach der quantitativen Bestimmung wurden Lösungen etwa gleicher Konzentrierung in natürlich isolierter und synthetischer Abscisinsäure getestet.

Tab. 15: Ergebnis der Amaranthuskeimtests von authentischer Abscisinsäure und aus Rosa canina isolierter Abscisinsäure. Im Biotet wurde die Hemmfraction 45 eingesetzt (vgl. Abb. 38)

Abcisinsäure = ABA

Menge ABA (aus FII) (Konzentration: molar)	Menge ABA (authentisch.)	Hemmung (%)
1×10^{-5}	1×10^{-5}	100
1×10^{-6}	1×10^{-6}	100
$5,32 \times 10^{-6}$		100
$5,32 \times 10^{-7}$		90
$7,2 \times 10^{-7}$		100
$7,2 \times 10^{-8}$		90
	1×10^{-7}	100
	$0,5 \times 10^{-7}$	90

Das Ergebnis des Amaranthuskeimtests zeigt, daß die keimungshemmende Wirkung der Fraktion II auf ihren Gehalt an Abscisinsäure zurückzuführen ist.

V. Diskussion

Bei der Untersuchung von Haferextrakten (*Avena sativa* und *Avena fatua*) auf Hemmstoffe waren von anderen Autoren bereits einige Substanzen beschrieben worden (Berrie, 1975; Karl, 1979; Lohaus, 1981). Berrie hatte kurzkettige Carbonsäuren genannt, Lohaus beschrieb 1,3,5-Pentantricarbonsäure als Hemmstoff, Karl beobachtete die inhibitorische Aktivität phenolischer Substanzen bei Keimung und Wachstum von mono- wie dikotylen Pflanzen. Mit Hilfe verschiedener Biotestmethoden waren sie in ihrer Wirkung untersucht worden. Auch in jüngsten Arbeiten wurde festgestellt, daß biologische Wirkstoffe gut mit Keimtests erkannt werden können und auf diesem Wege in ihrer Wirksamkeit beschrieben werden können (Isogai, 1984; Orito, 1986).

Als biologischer Detektor für den Erfolg eines jeden Aufarbeitungs- und Anreicherungs-schritt wurde in der vorliegenden Arbeit ein Keimtest mit *Amaranthus caudatus* angewandt. Dieser Test war bereits von Lohaus (1981) erprobt und optimiert worden. Bei der Identifizierung von Hemmfraktionen mittels Biotests hat es sich als unwesentlich erwiesen, ob mono- oder dikotyle Pflanzensamen zu einem Keimtest herangezogen werden. Insbesondere wegen des geringen Testvolumens von 1 ml je Petrischale im Vergleich zu 6 ml bei Hafersaattests wurde in den hier durchgeführten Versuchen dem *Amaranthus*-Keimtest der Vorzug gegeben.

In den Untersuchungen von Hafer und Flughafer war bei Karl (1979) und Lohaus (1981) darauf hingewiesen worden, daß leicht flüchtige Hemmstoffe bei den Aufarbeitungsschritten dem Nachweis entgangen waren, bzw. nicht mitefassen werden konnten. Besonders bei *Avena fatua* sollte die stärker ausgeprägte Hemmwirkung im Vergleich zu *Avena sativa* auf solche Stoffe zurückzuführen sein (Lohaus 1981). Auch bei der Durchsicht neuerer Literatur über Untersuchungen auf hemmaktive Stoffe hat sich gezeigt, daß aufgrund der Aufarbeitungswege leicht flüchtige Stoffe nicht erfasst werden konnten.

Tzuzuki (1987) beschreibt bei der Untersuchung von Buchweizen auf Hemmstoffe einen Aufarbeitungsweg, bei dem man das biologische Ausgangsmaterial mit Methanol extrahiert hatte. Um große Volumina zu verkleinern, wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei 35°C entfernt. Auch der weitere Aufreinigungsschritt der sauren Fraktionen mittels Säulenchromatographie endete mit dem Entfernen von Lösungsmitteln im Vakuum. Bei der nachfolgenden Untersuchung mit Gaschromatographie/ Massenspektrometrie hatte der Autor die Säuren derivatisiert und ein chromatographisches System gewählt, bei dem Fettsäuren mit weniger C-Atomen nicht miterfasst wurden. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Karl und Lohaus wurde in unseren Untersuchungen aber festgestellt, daß leicht flüchtige Hemmstoffe bereits bei Raumtemperatur im Vakuum abnehmen oder verschwinden. In Abblaseversuchen wurde dies untermauert; außerdem konnten leicht flüchtige Substanzen in einer Wasserfalle aufgefangen werden, die an eine Kurzwegdestillation im Stickstoffstrom angeschlossen war.

In dieser Arbeit wurden die Aufarbeitungsmethode so gewählt, daß der Verlust oder die Abnahme von flüchtigen Stoffen möglichst gering war. Als Lösungsmittel diente häufig Wasser; die Eluate der Säulenchromatographie an Sephadex-LH-20-Gel konnten sofort zum Biotest verwendet werden; Destillationsmethoden und auch die Gaschromatographie mit wässrigen Systemen, fanden Eingang in den Aufarbeitungsweg. So konnten besonders die "kleinen Moleküle" miterfasst werden, die in den vorangegangenen (Berrie 1975/ 1979) und auch späteren Arbeiten (Isogai,1987) dem Nachweis entgehen mußten. Hier wurde ein lückenloses Nachweisverfahren für alle homologen Carbonsäuren gefunden. Aliphatische Carbonsäuren bis C₈ konnten mittels Gaschromatographie an gepackter Säule nachgewiesen werden (vgl. Abb. 24), größere Moleküle wurden mittels Gaschromatographie an Kapillarsäulen untersucht. Bei der Gaschromatographie mit gepackten Säulen konnte sogar auf eine Derivatisierung verzichtet werden. Die Methode von Ranfft (1970/72), die bei der Untersuchung von Silagefutter erprobt worden war, konnte hier angewandt werden.

In der Zwischenzeit gibt es zwar weitere Verfahren zur Erfassung

leicht flüchtiger Stoffe, insbesondere gekoppelt mit der Gaschromatographie, "Tenax-Trapping -GC", ausführlich beschrieben bei Tsugita (1979) oder Head-space-Gaschromatographie (Mick/Schreier, 1984). Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, ähnlich wie manche Derivatisierungsverfahren, daß sie nicht zur präparativen Aufreinigung dienen können, also auch nicht für den hier wichtigen Biotest zur Verfügung stehen. Die einzige Derivatisierung die bislang nicht zu Verfälschungen im Biotest führte, war die Methylierung mit Diazomethan (Lohaus, 1981). Hier gab es lediglich eine Methode in der Literatur, bei der eine Vielzahl kleinerer Moleküle unterschiedlichster chem. Struktur während der Untersuchung von Reis auf flüchtige Komponenten beschrieben wurden. Diese Arbeit stand jedoch nicht in Zusammenhang mit Inhibitoreffekten. Eine modifizierte Rotavapormethode war hier das Kernstück der apparativen Ausrüstung (Bullard, 1977).

Berrie (1975), ebenso Tzuzuki (1987), untersuchten verschiedene Stoffe auf ihre inhibitorischen Eigenschaften. In den dort durchgeführten Biotests lagen die Konzentrationen der einzelnen Komponenten nicht unter 1×10^{-3} mol/l.

Bei den hier beschriebenen Versuchen sollte in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Karl (1979) und Lohaus (1981) erst dann von Hemmwirkung gesprochen werden, wenn auch niedrigere Konzentrationsstufen als 1×10^{-3} molare Lösungen Hemmaktivität zeigten. Andernfalls wurde ein keimungshemmender Effekt als "Konzentrationshemmung" bezeichnet, was bedeutet, daß eine beliebige Substanz das Wachstum hemmt, wenn sie nur hoch genug dosiert ist. Solche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung kurzkettiger Carbonsäuren an Gerstenendosperm beobachtet (Buller, 1976). Bei den inhibitorisch wirksamen Substanzen ist die Abnahme der Hemmwirkung nicht so abrupt. (Karl 1979; Lohaus, 1981). Durch Horizontaldestillation von Hagebuttenextrakt (vgl. IV.C.4.1) wurde wegen einer starken Anreicherung von Citronensäure in einer Fraktion eine Totalhemmung im Amaranthustest festgestellt. Bei nur geringfügiger Verdünnung waren die Keimlinge genauso entwickelt, wie der Wasserwert.

Andere Autoren versuchten, Gemeinsamkeiten bei neu gefundenen Hemmstoffen zu beschreiben, also eine Systematik für neu gefundene

Wirkstoffe zu finden. "Myrmic acids" wurden von Iwanami (1979) als Analogsubstanzen zu der von Schildknecht (1971) isolierten Hydroxy-decansäure beschrieben. Hier wurde postuliert, daß eine Kettenlänge zwischen 8 und 10 Kohlenstoffatomen und eine Carboxylgruppe für Hemmwirkstoffe Voraussetzung sind. Die Biotests, die dieser Aussage zugrunde gelegt wurden, gingen von synthetischen Substanzen aus, die in einer Konzentration von 100mg/l getestet wurden ($\approx 0,58 \times 10^{-3}$ mol/l, für Caprinsäure).

Gemische der einzelnen Substanzen untereinander wurden nicht getestet. Aliphatische Carbonsäuren mit weniger als 8 C-Atomen, höhere Alkohole, ein C_8 -Aldehyd und Lactone hatten keine Hemmwirkung. Die Hemmwirkung von Terpenen, die Heisey (1984) nach Isolierung aus Lippenblütlersamen beschreibt, wurde hier auch nicht näher untersucht. Bei Heisey war über ein sehr ähnliches Aufarbeitungsverfahren, wie in der hier vorgelegten Arbeit beschrieben, gelungen den Terpenalkohol Terpin-4-ol zu identifizieren und auf Bioaktivität zu untersuchen. Die niedrigste hemmaktive Konzentration bezogen auf den identifizierten Stoff lag bei 4×10^{-5} mol/l. Auch hier wurde darauf hingewiesen, daß bereits in den Biotestsschälchen ein Verlust an flüchtigen Stoffen auftrat, der das Ergebnis beeinflusste.

Guedner (1984) beschrieb die inhibitorischen Eigenschaften verschiedener niedermolekularer Stoffe auf das Wachstum von *Aspergillus flavus*. Er ordnete sie nach funktionellen Gruppen und fand als systematisches Ergebnis, daß Aldehyde, Ketone und Alkohole in absteigender Reihenfolge wirksam sind. Der "Blattaldehyd" (Tschesche, 1963) trans-hexenal zeigte höchste Wirksamkeit; der dazugehörige Alkohol (trans-hexenol) war unwirksam. Eine ähnliche Substanz wie das hier vermutete Hexenon wurde in der Gruppe der Ketone als wirksam beschrieben. Es handelte sich um 3-Penten-2-on. Die aktiven Komponenten waren bereits als Pflanzeninhaltsstoff beschrieben (Flath, 1978).

1986 erschien noch einmal eine Veröffentlichung, welche den Hemmeffekt der "Myrmic acids" näher untersuchte. Der Autor (Orito; 1986) untersuchte C_6 - C_{11} -Carbonsäuren einmal als nichtsubstituierte, gesättigte Carbonsäure, einmal als Hydroxysäuren. Der Autor beschrieb

dabei die Zusammenhänge zwischen Polarität und Keimrate und postulierte, daß unpolarere Säuren hemmaktiver seien als polarere. Es wurde aber nur die von Iwanami (1979) beschriebene Gruppe der "MYAs" betrachtet, bei den durchgeführten Tests waren keine Vergleichstests mit Dicarbonsäuren oder anderen Carbonylverbindungen berücksichtigt worden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen war die aliphatische, gesättigte Nonandisäure (Azelainsäure) zusammen mit Dihydrohämatinsäure in der Säurefraktion von Saathaferspelzen gefunden worden. Bisher ist diese Substanz in Zusammenhang mit Keimungshemmung nicht beschrieben worden (vgl. Lohaus, 1981).

Auch die Hemmstoffe der leicht flüchtigen Hemmfraktion bestehen aus Carbonsäuren, daneben findet sich ein Keton (Hexenon), das vermutlich aufgrund einer C=C-Doppelbindung in α -Stellung saure Reaktionen im wässrigen Milieu zeigt. Bei den Hemmtests mit *Amaranthus* zeigte sich hier, daß die Gemische aus Essigsäure/ Buttersäure und einem gesättigten Methylketon in einer Konzentration je $0,5 \times 10^{-3}$ mol/l Totalhemmung zeigten. Aufgrund der Untersuchungen konnte man ableiten, daß Gemische verschiedener Naturstoffe bei der Beurteilung als Hemmstoffe gesondert zu betrachten sind. Bei Iwanami (1979), der die Säuren nur als Einzelsubstanzen untersuchte, konnte kein Einfluß auf das Wachstum festgestellt werden.

Hasegawa, der 1983 einen neuen Hemmstoff aus Erbsensamen isolierte, identifizierte mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie eine aliphatische Carbonsäure mit einem Molekulargewicht von $m=284$, "Pisumin". Auf der Suche nach einer Systematik für die Hemmstoffe mit Säurecharakter findet man bei Isogai (1984) Hexylitaconsäure, eine Dicarbonsäure, isoliert aus *Aspergillus niger*, mit einer ungesättigten und einer gesättigten Seitenkette. Dieser Naturstoff zeigte im Keimungshemmtest mit Salatsamen bei einer Konzentrationen von 100 ppm eine signifikante Hemmwirkung, in niederen Konzentrationen jedoch eine positiv stimulierende Wirkung auf das Testmaterial. Derivate dieses Naturstoffes zeigten eine stärkere Hemmwirkung, Demnach hätte aber die freie Säurefunktion und die Doppelbindung allein noch keinen inhibitorischen Effekt. Die gleiche Wirkung war bei einem Biotest mit Reissamen zu beobachten. Der hier beschriebene

Hemmeffekt liegt jedoch auch in einem Bereich von ca. 1×10^{-3} mol/l, was gemäß der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnis bedeutet, daß eine Konzentrationshemmung nicht auszuschließen ist. Testergebnisse einer Konzentrationsreihe lagen nicht vor.

Im Vergleich mit der inhibitorischen Wirkung von Dihydrohämatinsäure und Nonandisäure, hier erstmalig in der Säurefraktion von Saathafer gefunden, hatte letztere eine gleichmäßige Hemmwirkung linear zur Konzentration; eine Wachsförderung bei niedrigen Konzentrationen, wurde nie beobachtet, die durchschnittliche Primärwurzellänge im Vergleich zum Wasserwert war nicht größer. Bereits während der Untersuchungen von Karl (1979) und Lohaus (1981) war festgestellt worden, daß im Verlauf der Säulenchromatographie wachsfördernde Stoffe von hemmenden Stoffen abgetrennt wurden. Diese Ergebnisse galten ebenfalls für verschiedenen Konzentrationsbereiche. Bei Routinebiotests nach Sephadexchromatographie waren diese Ergebnisse bestätigt worden. Es scheint sicher, daß niedermolekulare Säuren allgemein in dormanten Samen eine wachstumsretardierende Wirkung ausüben. Leichtflüchtige Säuren und Carbonylverbindungen werden durch Temperatur und Wasser "abgedampft" oder "ausgespült", schwerer flüchtige möglicherweise auf oxidativem Weg entfernt; gegen Ende dieser Prozesse nimmt die Keimfähigkeit zu und der Samen beginnt zu wachsen.

Der Gehalt an endogener Abscisinsäure(ABA) (Jackson, 1968;) verursacht neben einem anderen in der Säurefraktion vorhandenen Hemmstoff (Lohaus, 1985) die hartnäckige Keimruhe bei Rosa. Parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen erschien die Untersuchung von Tillberg (1983). Über den Weg der alkalischen Hydrolyse und den bereits bei Hafer beschriebenen Aufarbeitungsweg konnte ABA relativ schnell nachgewiesen werden. Die Arbeit beschäftigte sich weiterhin mit der Veränderung des ABA-Gehalts während der Kältebehandlung (14 Wochen bei 4°C) und der frühen Keimphase von Rosa rugosa. Unklar blieb auch weiterhin, ob die Abnahme von ABA in unmittelbarem Zusammenhang mit der zunehmenden Keimfähigkeit steht. Letzendlich betrug die Keimrate nur 1% nach kalter Stratifikation; der Gehalt an ABA war in diesem Zeitraum um 90% abge-

sunken. Im Vergleich der Konzentration ergab sich bei Tillberg ein Gehalt von 2,7µg/g Frischgewicht, hier wurden 5µg/g bei z.T. tiefgekühlten Hagebutten bestimmt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wurden Saathaferspelze, Flughafen und Hagebutten auf einen möglichen Gehalt an niedermolekularen Keimungshemmstoffen untersucht. Bei diesen Pflanzen waren bereits von verschiedenen Autoren keimungsinhibitorische Effekte auf die Samen der eigenen und fremder Spezies beschrieben worden.

Für einige dieser Hemmstoffe waren bereits chemische Strukturen ermittelt worden. Die Hemmwirkung der Pflanzenextrakte konnte jedoch nicht vollständig durch die beschriebenen Strukturen geklärt werden. Es wurde mehrfach erwähnt bzw. vermutet, daß gerade auch leicht flüchtige, wasserlösliche Substanzen an der Hemmwirkung beteiligt sind.

2. Durch Heißwasserextraktion wurden aus Saathaferspelze wässrige Rohextrakte gewonnen. Diese wurden über eine Sephadexsäulenchromatographie in verschiedene Hemmfraktionen eingeteilt, nachdem über Etherextraktionen eine Einteilung in eine Neutral- und eine Säurefraktion erfolgt war. Die Aufarbeitungsschritte, die zu der Identifizierung der genannten Substanzen führten, waren:

- Wasserextraktion
- Etherextraktion
- Horizontaldestillation/Kurzwegdestillation
- Hochdruckflüssigchromatographie
- Gaschromatographie
- Gaschromatographie / Massenspektrometrie

Aus Saathafer konnte zum erstenmal in der pH-1-Fraktion Dihydrohämatisäure (1,3,5-Pentantricarbonsäure) neben Azelainsäure (Nonandisäure) als hemmaktive Komponente isoliert werden. Nonandisäure wurde bislang nicht in diesem Zusammenhang in der Literatur erwähnt. Durch Biotests mit *Amaranthus caudatus* (Fuchsschwanz) wurden Vergleiche der biologischen Aktivität bei natürlichen Hemmfraktionen und den synthetischen Substanzen durchgeführt. Darüberhinaus wurde eine leicht flüchtige Hemmfraktion isoliert, die jedoch hier nicht näher auf ihre Zusammensetzung untersucht wurde.

3. An Flughafer wurde eine leicht flüchtige Hemmfraction untersucht, die aufgrund ihrer Bioaktivität und dem Verhalten bei Destillationsverfahren und gaschromatographischen Bestimmungen ähnlich beschaffen zu sein schien, wie die leicht flüchtige Hemmfraction, die bei der Untersuchung von Saathaferspelzen abgetrennt worden war. Über Horizontaldestillation und Gaschromatographie an gepackter Glassäule konnte das Gemisch aus leichtflüchtigen Komponenten aufgetrennt werden; die Identifizierung erfolgte an einem GC/MS-System. Als erfassbare Komponenten wurden so Essigsäure, Buttersäure und ein möglicherweise als Hexenon zu bezeichnendes Keton identifiziert.

Daß die inhibitorische Wirkung der Haferextrakte - sowohl bei Saathaferspelzen als auch bei Flughafer - auch auf den Gehalt an leicht flüchtigen Stoffen zurückzuführen ist, konnte durch Abblaseversuche im Stickstoffstrom untermauert werden. Eine synergistische Wirkung verschiedener, als natürliche Bestandteile identifizierter organischer Säuren, konnte nicht beobachtet werden. Es wurde lediglich eine Konzentrationshemmwirkung in Bereichen um 10^{-3} mol/l einiger Komponenten festgestellt.

4. Hagebutten wurden in gleicher Weise wie Flughafer und Saathaferspelze in verschiedene Etherextrakte aufgeteilt. Zusätzlich zur pH-7- und pH-1- Extraktion wurde eine Ammoniakverseifung durchgeführt. Über Säulenchromatographie an Sephadex LH-20-Gel und Hochdruckflüssigchromatographie wurde die bereits als Hagebutteninhaltsstoff und Keimungsinhibitor ausreichend beschriebene Abscisinsäure sowohl aus der verseiften Fraktion, als auch in der Säure- Fraktion, gefunden. Die Identifizierung erfolgte mittels Gaschromatographie und HPLC.

Eine weitere als Hemmfraction abgetrennte Fraktion der pH-1-Extraktion enthielt große Mengen an Citronensäure. Hier war der Effekt der Konzentrationshemmung besonders deutlich zu beobachten. Daraus ergab sich für die Biotests die Notwendigkeit, nicht nur den Bezug zum wässrigen Rohextrakt für die Verdünnungen bzw. Anreicherungen, die zur Durchführung des Biotest notwendig waren, als Berechnungsgrundlage heranzuziehen. Die zu testenden Fraktionen wurden aufgrund dieser Erfahrung parallel zum Hemmtest gaschromatographisch untersucht. Dabei konnte über die Größe der Peakflächen ei-

ne schnelle Aussage über die Konzentration der Lösungen gemacht werden, bevor sie für den Biotest eingesetzt wurden. Auf diese Weise konnte die Konzentrationshemmung ausgeschlossen werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackman, R.G., Porous Polymer Bead Packings and Formic Acid in GC of volatile fatty acids, *J. Chromatogr.*, 10 560-565 (1972)
- Atwood, W. M., A Physiological Study of the Germination of *Avena fatua*, *Bot. Gaz.*, 57 386 (1914)
- Benoit, F; Holmes, J.L., The Mass Spectra of Carboxylic Acids, 1: Fragmentation Mechanisms in Maleic and Fumaric Acids and related Compounds, *Organic Mass Spectrometry*, 2 591-601 (1969)
- Berrie, A., The Occurence and Function of Short Chain Length Fatty Acids in Plants, *Plant Science Letters*, 6 163-173 (1975)
- Berrie, A., Possible Role of Volatile Fatty Acids and Absciscic Acid in the Dormancy of Oats, *Plant Physiol.*, 63 758-764 (1979)
- Black, M., The Role of endogenous Hormones in Germination and Dormancy, *J. Bot.*, 29 181-192 (1980)
- Black, T.H., Preparation and Reactions of Diazomethane , *Aldrichimica Acta*, 16 3-10 (1983)
- Böhme, W.; Oehme, U.; Steinwand, M., Moderne HPLC- Chromatographie von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln, *Lebensmittelchemie, gerichtliche Chem.*, 38 88-91 (1984)
- Börner, H., Untersuchungen über phenolische Verbindungen aus Getreidestroh und Getreiderückständen, *Naturwissenschaften*, 42 583 (1955)
- Brunner, K., Untersuchungen über die Zusammensetzung des Kakaoaroma, Dissertation Universität München (1978)
- Büchel, K.H., Synthesekonzepte zu neuen biologischen Wirkstoffen, *Naturwissenschaften*, 66 173-181 (1979)
- Bullard, R. W.; Holguin, G., Volatile Compounds of Unprocessed Rice, *J. Agric. Food Chemistry*, 25 99-108 (1977)
- Buller, D.; Parker, W.; Reid, J.S.G., Short chain fatty acids as inhibitors of Gibberellin-induced amyololysis in barley endosperm, *Nature*, 260 169-170 (1976)
- Chen, S.S.C.; Varner, J.E., Hormones and Seed Dormancy, *Seed Sci. & technol.*, 1 325-338 (1973)

- Chen, S.S.C.; Varner J.E., Chemical Constituents in wild Oat Hulls and their Effect on Seed Germination, Canadian J. Plant Sc., 62 155-161 (1982)
- Chrompack News, 10 (1983)
- Conover, D. G.; Geiger, D. R., Germination of Australian Channel Millet (*Echinochloa turnerana* J.M.Black) Seeds. I. Dormancy in Relation to Light and Water, Aust. J. for. Plant Physiology, 11 395-408 (1984)
- Di Corcia, A., GC of free fatty Acids, Analytical Chemistry, 45 492-496 (1973)
- Dörfling, K., Growth , Progress in Botany, 47 142-154 (1985)
- Dosman, J.; Crawhall, J.C.; Klassen, G.A.; Mamer, O.A.; Neumann, P., Urinary Excretion of C6- C10 Dicarboxylic Acids in Glycogen Storage Disease Types I+III, Clinica Chimica Acta, 51 93-101 (1979)
- Elstner, E. F., Abstrakt über Wundgase, Entstehung von Blattaldehyd trans-2-Hexenal, Biologie in unserer Zeit, 3 (1978)
- Evenari, M.; Garb, Germination Inhibitors, Bot. Rev., 15 153 (1949)
- Fischer, W.G., Neuer automatischer Horizontaldestillator mit Kapillarkolonne. eine hochwirksame Fraktionierapparatur zu Trennung kleinster Stoffmengen, GIT Fachz. Lab., 18 681-752 (1974)
- Fischer, H.P., Langzeitbeobachtung über den Zusammenhang von Samenkeimung und Sonnenfleckentätigkeit, Ber. Deutsche Bot. Gesellschaft, 95 457-464 (1982)
- Flath, R.A.; Forrey, R.; John, J.O.; Chan, B., Agric. Food Chem., 26 1290 (1978)
- Gill, M.S.; MacLeod, A. J.; Moreau, M., Volatile Compounds of Cocoa with Particular Reference to Glucosinolate Products, Phytochemistry, 23 1937-1942 (1984),
- Groves, R. H.; Hagon, M.W.; Ramakrishnan, P.S., Dormancy and Germination of Seed of eight Populations of *Themeda australis*, Aust. J. Bot., 30 373-386 (1982)
- Groß, D., Wachstumsregulatorisch wirksame Pflanzeninhaltsstoffe, Zeitschrift für Chemie, 11 397-405 (1980)
- Guedner, R.C.; Wilson D. M.; Heidt A. R., Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*, J. Agric. Food Chemistry, 33 411-413 (1985)
- Günther, K., Die Waffen der Wehrlosen , Natur 4 25-33 (1984)

- Haberlandt, G., Sitzungsber. Akad. Wien, 93 122 (1886)
- Häggquist, M.L.; Petterson, A.; Liljenberg, C., Growth Inhibitors in Oat Grains. Leakage of Inhibiting Factors from Oat Grains during Imbibition and the Effect of these on Germination and Growth, *Physiol. Plant.*, 61 75-80 (1984)
- Hasegawa, K.; Koreeda, M.; Hase, T., A new Growth Inhibitor, Pisumin, involved in Light Inhibition of Epicotyl growth of Dwarf Peas *Plant Physiol.*, 72 391-393 (1983)
- Hasegawa, K.; Shiihara, S.; Iwagawa, T.; Hase, T., Isolation and Identification of a new Growth Inhibitor, Raphanusin, from radish Seedlings and its Role in Light Inhibition of hypocotyl Growth, *Plant Physiol.*, 70 626-628 (1982)
- Hasegawa, K.; Knecht, E.; Bruinsma, J., Caprolactam, a Light-Promoted Growth Inhibitor in Sunflower Seedlings, *Phytochemistry*, 11 2611-2612 (1983)
- Heisey, R. M.; Delwiche, C.C., Phytotoxic Volatiles from *Trichostema lanceolatum*, *Amer. J. Bot.*, 71 821-828 (1984)
- Hermann, K., Über Oxizimtsäuren in Getreideblättern, *Die Naturwissenschaften*, 45 111 (1958)
- Holmes, J.L.; Jean, T.St., The Mass Spectra of Carboxylic Acids-II: Fragmentation Mechanisms in The Homologous Series $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$. *Organic Mass spectrometry*, 3 1505-1518 (1970)
- Holan, G., US-Patent No. 3481 993, v. 12.12.1966; *Nature*, 221 734 (1969)
- Howe, I.; Williams, D.H., Studies in Mass Spectrometry, Part XXIII. The Mass Spectra of Dimethylesters; Methoxymigrations in the Mass-spectra of Dimethylesters, *J. Chem. Soc.*, (c) 202-209 (1968)
- Isogai, A.; Washizu, M.; Kondo, K.; Murakoshi, Sh.; Suzuki, A., Isolation and Identification of (+),-Hexylitaconic Acid as a Plant Growth Regulator *Agric. Biol. Chem.*, 48 2607-2609 (1984)
- Iwanami, Y.; Iwadare, T., Myrmic Acids, a Group of new Inhibitors analogous to Myrmicacin, *Bot. Gaz.*, 140 1-4 (1979)
- Jackson, G.A.D., Hormonal Control of Fruit Development, Seed Dormancy and Germination with particular Reference to *Rosa*, *Sci. Monogr.*, 31 127-156 (1968)

- Jackson, G.A.D.; Blundell, J.B. Germination in Rosa, *Hortic. Sci.*, 38 310-320 (1963)
- Jayachandran, N.; Sidhar, K. R., Phenolic Compounds in Rice Husk, *Biolog. Plantarum*, 17 318 (1975)
- Jusaitis, M.; Paleg, L.G.; Aspinall, D., The influence of Gibberellic Acid and Temperature on the Growth Rate of Avena sativa stem Segments, *Plant. Physiol.*, 70 532-539 (1982)
- Jüttner, F., Nor- Carotenoids as the major Volatile Excretion Products of Cyanidium , *Zeitschr.f. Naturforschung*, 34 186-190 (1979)
- Jüttner, F.; Leonhardt; Möhren, Environmental Factors offering the Formation of Mesityloxide and other Volatiles, *J. Gen. Microbiology*, 407-412 (1983)
- Khan, M. I., Allelopathic Potential of dry Fruits of Washingtonia filifera Inhibition of seed Germination, *Physiolog. Plant*, 54 323-328 (1982)
- Karl, R., Keimungshemmende Extrakte aus Hafer, Dissertation Universität München, (1978)
- Kazeniak, S. J., Flavour Chemistry of Tomato Volatiles, *J. Food Science*, 35 519-529 (1970)
- Ketring, D. L., Germination Inhibitors, *Seed Science and Technology*, 1 305 (1973)
- Kubeczka, K.-H., Chromatografische Kombinationstechniken bei der Analyse von Naturstoffen, *Planta Medica*, 34 291-307 (1979)
- Larson, P.; Peach, K.; Trasey, M. V., Growth Substances in higher Plants, *Modern Methods of Plant Analysis*, Springer Verlag B.G.H., 3 565 (1955)
- Lohaus, E., Keimungshemmstoffe aus Hafer, Dissertation Universität München, (1981)
- Lohaus, E.; Zenger, C.; Rüdiger, W., Natural Inhibitors of Germination an Growth III, New Pyrones from Seeds of Rosa canina *Z. Naturforsch.*, 40 490-495 (1985)
- Mertens, R.; Weiler, E. W., Kinetic Studies on the redistribution of endogenous Growth Regulators in gravireakting Plant Organs, *Planta*, 158 339-348 (1983)
- Mick, W.; Schreier, P., Additional Volatiles of Black Tea Aroma, *J. Agric. Food Chem.*, 32 924-929 (1984)

- Oladian, J.A.; Mumford, M.P., The Stimulation of Seed Germination by Temperature and Light in Agronomic Amaranthus species, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 180 45-54 (1985)
- Orito, K.; Seki, Y.; Watanabe, A.; Matsumoto, M.; Iwadare, T., Relationship between inhibitory Activity of Myrmicacin analogues on Camellia Japonica pollen Germination and their Lipophilicity, *Phytochemistry*, 25 941-943 (1986)
- Randolph, T.M.; Marchini, P.; Sproston, T., Isolation from Gingko biloba Leaves of an Inhibitor of Fungus Growth, *The Journal of Biological Chemistry*, 235 3298-3299 (1960)
- Ranfft, K., Gaschromatografische Bestimmung kurzketziger, flüchtiger Fettsäuren im Pansensaft, *Arch. Tierernährung*, 23 343-353 (1973)
- Reynolds, T., Comparative Effects of aliphatic compounds on Inhibition of Lettuce Fruit Germination, *Ann. Bot.*, 41 437-48 (1977)
- Römpf, Lexikon der Chemie (1974)
- Schildknecht, H.; Koob, K., Myrmicacin, das erste Insekten Herbizid, *Angew. Chem.*, 83 110 (1971)
- Schildknecht, H.; Koob, K., The first Insect Herbicide, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 10 124-125 (1972)
- Schildknecht, H., Reiz- und Abwehrstoffe höherer Pflanzen, ein chemisches Herbarium, *Angew. Chemie*, 93 164-183 (1981)
- Schrader, G., Organische Phosphorverbindungen als neuartige Insektizide, *Angew. Chemie*, 62 471-473 (1950)
- Schwarzenbach, R., High- Performance Liquid Chromatography of Carboxylic Acids, *J. Chromatogr.*, 251 339-358 (1982)
- Seta, K.; Washitake, M.; Tanaka, I., High Performance Anion-Exchange Chromatography of Human Urine, using Perchlorate Gradient Elution Systems, *J. Chromatogr.*, 221 215-225 (1980)
- Shimizu; Watanabe, Volatiles in Grape Musts, *Agric. Biol. Chem.*, 46 2265-2274 (1982)
- Shimomura, H.; Sashida, Y.; Nakata H.; Kawasaki, J.; Ito, Y., Plant Growth Regulators from Heracleum lanatum, *Phytochemistry*, 21 2213-2215 (1982)
- Spiteller, G., The Language of biological Fluids, *Pure & Appl. Chem.*, 50 205-217 (1978)

- Stajkow, Untersuchungen über die Keimruhe der Samen in Abhängigkeit von ihrem Reifegrad, Wiss. Arb. höherer Landwirtschaft Inst. Wassilkolaeow- Plondiw, Zit. nach Landwirtschaftl. ZBl. Abt.11., 6 (1959)
- Stom, D. J., Effect of Polyphenols on Shoot and Root Growth and on Seed Germination, *Biologia Plantarum*, 24 1-6 (1982)
- Swain, T., Secondary compounds as Protective Agents, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 28 479-501 (1977)
- Takeshi, S.; Nukina, M., Makrophorin D, a new Self- Growth Inhibitor of the Causal Fungus of Macrophoma Fruit rot of Apple, *Agric. Biol. Chem.*, 48 1923-1925 (1984)
- Tietz, A.; Kasprik, W., Identification of Absciscic Acid in a green Alga, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 181 269-274 (1986)
- Tschesche, R.; Schacht, U.; Legler, G., *Justus Liebigs Ann. Chemie*, 662 113 (1963)
- Tillberg, E., Levels of endogenous absciscic acid in Achenes of *Rosa rugosa* during Dormancy Release and Germination, *Physiol. Plant.*, 58 243-248 (1983)
- Tsugita, T.; Imai, T.; Doi, Y.; Kurata, T.; Kato, H., GC and GC/MS Analysis of Headspace Volatiles by Tenax GC Trapping Techniques, *Agric. Biol. Chem.*, 43 1351-1354 (1979)
- Tsuzuki, E.; Yamamoto, Y.; Shimizu, T., Fatty acids in Buckwheat are Growth inhibitors, *Annals of Botany*, 60 69-70 (1987)
- Weiler, E.W., Radioimmunoessays for the Differential and Direct Analysis of free and Conjugated Absciscic Acid in Plant Extracts, *Planta*, 148 262-272 (1980)
- Water Ass., Paired-Ion-Chromatografie (1980)
- Yamane, H.; Sugawara, J.; Suzuki, Y.; Shimamura, E.; Takahashi, N. Synthesis of Jasmonic Acid Related Compounds and their Structure-Activity Relationships on the Growth of Rice Seedlings, *Agric. Biol. Chem.*, 44 2857-2864 (1980)
- Yaham, I., Volatile Flavour Compounds of Kogyoko Apples, *J. Agric. Biolog. Chem.*, 48 849-855 (1984)

LEBENS LAUF

30.12.53	geboren in Wuppertal
4.60 - 4.64	Grundschule in Remscheid-Lüttringhausen
4.64 - 6.73	neusprachliches Gymnasium in Remscheid-Lennep
6.73	Abitur
10.73 - 10.75	Wehrdienst als Sanitäter
11.76 - 6.81	Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
6.81	1.Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
9.81 - 11.84	Assistent unter Prof. Dr. W. Rüdiger am Bot. Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
1.85 - 7.85	Praktikum am Landesuntersuchungsamt München
7.85	2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
seit 3.7.85	selbständig tätig als Lebensmittelchemiker auf dem Fachgebiet der Weinchemie.

